

OVARIELLE UND UTERINE STEROID- UND
PROSTAGLANDIN- SEKRETION WÄHREND DER
ERSTEN 5 WOCHEN DER GRAVIDITÄT BEIM RIND

EDUARD ABELE

Disbui. München

1987

Aus dem Institut für Physiologie der
Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt für
Milchwirtschaft Weißenstephan
der Technischen Universität München
Direktor: Professor Dr. Dr. h.c. Heinrich Karg
vorgelegt über das Institut für Physiologie,
Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Ovarielle und uterine Steroid- und Prostaglandin-

Sekretion während der ersten 5 Wochen

der Gravidität beim Rind

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Eduard Abele

aus

Lauben

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan:..... Prof. Dr. H. Zucker

Referent:..... Prof. Dr. U. Lösch

Koreferent:..... Prof. Dr. D.O. Schmid

Tag der Promotion:..... 27. Februar 1987

INHALTSVERZEICHNIS

Einleitung	1
1. Literatur	2
1.1. Immunologische Betrachtung der Frühgravidität	2
1.2. Early pregnancy Factor (EPF)	6
1.3. Erkennung und Erhaltung der Gravidität	8
2. Methoden und Material	14
2.1. Tierversuche	14
2.1.1. Versuchsplanung	14
2.1.2. Tiermaterial	16
2.1.3. Versuchsdurchführung	16
2.1.4. Operation	18
2.1.5. Problematik objektiver Bestimmung der Position von Vena cava caudalis Kathetern	20
2.1.6. Blutentnahme und Konservierung	21
2.2. Hormonanalytische Verfahren	22
2.2.1. Allgemeines	22
2.2.2. Radioimmuntest	22
2.2.2.1. Validierung der Tests	29
2.2.2.2. Zusammenfassung der im Test verwendeten Antisera	32
2.2.2.3. Direkttest	34
2.2.3. Radioimmuntest nach Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (HPLC)	36
2.2.3.1. Methanolextraktion	37
2.2.3.2. Kartuschenreinigung mit Minikartuschen	37
2.2.4. Enzymimmuntest (EIA)	40
2.2.4.1. Durchführung der Kopplung von PGF _{2a} und PGFM an die alkalische Phosphatase	41
2.2.4.2. Zweidimensionale Titerbestimmung	43
2.2.4.3. Durchführung des EIA	44
2.2.4.4. Eichkurven	45

2.2.4.5.	Kreuzreaktion von PGF_{2a}^* im Vergleich zu 15-keto- PGF_{2a}	46
2.3.	Materialien	47
2.3.1.	Chemikalien	47
2.3.2.	Biochemica	47
2.3.3.	Lösungen und Puffer	48
2.3.4.	Lösungen und Puffer für den Enzym- immuntest (EIA)	49
2.3.5.	Medikamente	50
2.3.6.	Materialien und Geräte	50
3.	Ergebnisse	52
3.1.	Vorbemerkungen	52
3.2.	Physiologische Ergebnisse der Tierversuche	53
3.2.1.	Kurzzeitsekretion der Ovarsteroido Progesteron und Östradiol-17 β	53
3.2.1.1.	Brunstzyklus	53
3.2.1.2.	Frühgravidität Tag 0 - Tag 16	57
3.2.1.3.	Zusammenfassende Darstellung von Progesteron und Östradiol-17 β während der Frühgravidität Tage 2 - 23	62
3.2.1.4.	Vergleichende Messungen in der Vena cava caudalis und der Aorta abdominalis während des Brunstzyklus und der Früh- gravidität Tage 1 - 16	65
3.2.2.	Vergleichende Konzentrationsmessungen der Ovarsteroido und von Prostaglandin F_{2a} in der Vena cava caudalis während der Frühgravidität und während des Brunst- zyklus (Tage 14 - 31)	74
3.2.3.	Prostaglandin-Sekretion während der Tage 28 - 34 der Frühgravidität	84
3.2.3.1.	Primäres Prostaglandin F_{2a} ,	84
3.2.3.2.	Vergleich von primären und metaboli- sierten Prostaglandinen in Vene und Arterie	86

3.2.4.	Östradiol-17 β -, 6-keto-PGF _{1α} - und PGF _{2α} -Sekretion während der ersten 5 Wochen der Gravidität	90
3.2.5.	Ovarsteroid- und Prostaglandin-Sekretion während der Luteolyse im Vergleich zur Frühgravidität	92
4.	Diskussion	96
4.1.	Zur Erfassung der Kurzzeitsekretion von Ovarhormonen	96
4.2.	Kurzzeitsekretion der Steroidhormone und Prostaglandine während des Brustzyklus und der Tage 1 - 31 der Frühgravidität	98
4.3.	Prostaglandin - Sekretion während der Graviditätstage 28 - 34	106
5.	Zusammenfassung - Summary	110
6.	Literaturverzeichnis	116
7.	Tabellenanhang	137

Lebenslauf

* Bemerkung:

Aus drucktechnischen Gründen wird PGF_{2 α} und 6-keto-PGF_{1 α} mit
PGF_{2 α} und 6-keto-PGF_{1 α} bezeichnet.

Einleitung

Die Erforschung heute noch weitgehend unbekannter Regulationsmechanismen für die Erkennung und Erhaltung der Gravidität, speziell der Frühgravidität, ist beim Rind von wesentlicher volkswirtschaftlicher Bedeutung.

Fruchtbarkeitsprobleme verursachen jährlich einen wirtschaftlichen Verlust von über einer Milliarde DM, wobei 50 % dieser Summe durch nicht erfolgreiche oder verspätete Konzeption entstehen (Lotthammer 1985).

Eine bessere Kenntnis der endokrinen Grundlagen ist auch im Rahmen der Biotechnik von Interesse, z.B. bei Embryotransfer oder Blastocystenmanipulationen. So könnten eingehende Untersuchungen von Konzentrationsänderungen einiger fertilitäts-spezifischer Hormone nach Embryotransfer erkennen lassen, wie und vor allem wie schnell die Reproduktionsorgane Hypophyse, Ovar und Uterus auf die Anwesenheit bzw. auf den Verlust eines Embryos reagieren.

Die Aufklärung dieser Mechanismen bei der Spezies Rind, bei der kein Choriongonadotropin (hCG) wie beim Menschen und keine erhöhten Östrogen - Konzentrationen wie beim Schwein aufgezeigt werden konnte, steht im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit.

Durch Erfassung von Sekretionsprofilen der Ovarsterioide Progesteron und Östradiol-17 β sowie von Prostaglandin F_{2a} und des Metaboliten von PGI₂, 6-keto-PGF_{1a} während der ersten Graviditätstage im Vergleich zum Brunstzyklus sollte versucht werden, mögliche endokrine Veränderungen auf erste Interaktionen des Konzeptus mit dem Muttertier aufzuzeigen.

Desweiteren sollten die hormonellen Zusammenhänge eines verlängerten Zyklus durch die Bestimmung von Prostaglandin F_{2a} und des Metaboliten von PGI₂, 6-keto-PGF_{1a} in Verbindung mit Progesteron und Östradiol-17 β erklärt werden.

1. LITERATUR

1.1 Immunologische Betrachtung der Frühgravidität

Das maternale Immunsystem wird durch das Eindringen genetisch fremden Materials zur Immunabwehr herausgefordert. Es wäre zu erwarten, daß fremde Antigene phagozytiert werden. Obwohl Embryonalgewebe nicht genetisch identisch mit jenem des Muttertieres ist, kann es sich in utero weiterentwickeln.

Dies wird graviditätsspezifischen Substanzen und Schutzmechanismen zugeschrieben und ist eine Voraussetzung für die Existenz höherer Lebewesen.

Medawar (1953) postuliert einige Theorien die zur Erklärung dieses Phänomens herangezogen werden können.

a. Veränderung der maternalen Immunkompetenz

Progesteron, das während einer Gravidität in großen Mengen produziert wird, ist nach Siiteri und Stites (1982) das Schlüsselhormon mit sehr starken immunsuppressiven Eigenschaften. Die lokale uterine Immunkompetenz gegen fremde paternale "Transplantationsantigene" wird "down" reguliert und damit das Überleben des Trophoblasten gesichert.

Östrogene haben ebenfalls einen wesentlichen Einfluß auf das Immunsystem. Lokale Konzentrationen in der Plazenta sind viel höher als in der Peripherie (Siiteri et al. 1977).

Sie können je nach Dosis entweder das Immunsystem unterdrücken oder auch stimulieren.

Ihr Effekt ist außerdem abhängig von Alter (Reilly et al. 1967), Spezies (Nelson et al. 1967) und dem Zeitpunkt der "Immunisierung" (Feigen et al. 1978). Ebenfalls lange bekannt ist die zerstörerische Wirkung der Östrogene auf das Knochenmark (Thompson et al. 1964).

Nicht nur Progesteron und Östrogene werden während einer Gravidität in den Ovarien und bei manchen Spezies zusätzlich in der Plazenta gebildet, sondern auch Glucokorticoide, die ebenfalls eine immunsuppressive Wirkung entfalten (Hogarth 1982).

b. Verringerte Immunabwehr innerhalb des Uteruslumens

Während im Diöstrus intrauterin verpflanzte Hauttransplantate bei Ratten in der üblichen Weise abgestoßen werden, kann nach Versuchen von Beer und Billingham (1974) eine geringgradige Verlängerung der Überlebenszeit bei Implantation in einen postöstrisch rezeptiven Uterus beobachtet werden. Bei Sensibilisierungsversuchen der gleichen Autoren mit väterlichen Alloantigenen zeigten sich bei Ratten im Verlauf der Gravidität keine Abstoßungsreaktionen gegenüber den Feten, wogegen intrauterin implantierte Tumore abgestoßen wurden (Schlesinger 1962). Dies zeigt, daß der Schutz, den die paternalen Antigene genießen, weniger in der immunologisch privilegierten Stellung des Uterus begründet liegt, als vielmehr mit der Funktion der Eihäute, die den Fetus umgeben, zusammenhängt. Eine Bestätigung dieser Theorie ist die bei verschiedenen Spezies vorkommende Möglichkeit einer extrauterinen Gravidität (Meizner et al. 1983).

c. Transplantationsantigene bei Trophoblast und Fetus

Chatterjee-Hasrouni und Lala (1979) haben mit immunologischen Methoden starke Transplantationsantigene (H-2 Antigene) bei Mäusetrophoblasten nachgewiesen und widerlegten damit die lange vertretene Meinung, daß der Fetus keine individuellen antigenen Eigenschaften besitzt, die eine Reaktion der Mutter hervorrufen können (Little 1924).

"Major"-Histocompatibility-Complex-Antigene (MHC-Antigene) werden nach Dausset (1981) als Hauptziel der immunologischen Abwehrmaßnahmen angesehen. β -2 Mikroglobulin, das nicht kovalent an MHC-Antigene gebunden ist, konnte von Meziou et al. (1983) an Schweineblastozysten und von Sawicki et al. (1981) auf Mäusezygoten nachgewiesen werden.



Epstein et al.(1980) beschrieben zusätzlich "Minor"-Histo-kompatibilitätsantigene, so daß heute feststeht, daß der Em-bryo sowohl "starke" als auch "schwache" Antigene besitzt, während der Trophoblast nur schwache antigene Eigenschaften aufweist.

Um eine Abstoßung zu verhindern, müssen Substanzen vorhanden sein, welche die Transplantationsantigene maskieren können. Studien von Voisin und Chaouat (1974) führen die Reduzierung der Immunabwehr auf maternale, antipaternale Antikörper zurück, wogegen Faulk und Galbraith (1979) Transferrin bzw. andere nicht näher differenzierte Substanzen für die feh-lende Abstoßungsreaktion verantwortlich machen.

Dem Uteroglobulin (MG 14 - 15000), das beim Kaninchen bereits während der ersten Tage einer Gravidität in der Uterusflüssig-keit bestimmt wurde, werden ebenfalls immunsuppressive Eigen-schaften zugeschrieben (Beier 1968, 1974).

In Verbindung mit β -2 - Mikroglobulin soll es die H-2 Antigene maskieren und so die maternalen Lymphozyten hindern, die Sper-mien bzw. die Blastozyste als Fremdartigen zu erkennen.

Neben dieser spezifischen Hemmung der Immunabwehr müssen unspezifische, lokal immunsuppressiv wirkende Substanzen, die nur während der Gravidität nachzuweisen sind, vorhanden sein.

Eine Reihe solcher Substanzen wurden von verschiedenen Autoren bei unterschiedlichen Spezies nachgewiesen.

So werden z.B. α -Fetoprotein (AFP) (Yachin 1976, Murgita und Tomani 1975), Human Choriongonadotropin (hCG) (Contractor und Davis 1973, Adcock et al. 1973), Human Placental Lactogen (hPL) (Contractor und Davis 1973), schwangerschaftsspezi-fisches β -1 Glykoprotein (SP 1) (Tatarinov 1982) oder Preg-nancy-Associated-Plasma-Protein A (PAPP-A) (Bischof et al. 1982) als immunsuppressive Substanzen angesehen.

"klassische" Graviditäts - Hormone Enzyme Proteine	"neue" Graviditätsfaktoren	graviditätsassoziierte Produkte
Steroide hCG = human Chorion-Gonadotropin PMMSG = Pregnant Mare Serum Gonadotropin hPL = human placental lactogen	bTbP I = bovines Thromboplastenprotein I Protein B	1. fetale Proteine: - Fetoprotein, Fetuin Early Pregnancy Faktor 2. plazentäre Proteine: hCG, PMMSG, SP 1 PAPP-A = pregnancy associated Protein A PP-5 = Plazentaprotein 5 OCG = ovines Choriongonadotropin PAMP 2 = pregnancy associated murin Serumprotein 2 3. maternale Proteine SBBG = steroidbindendes β-Globulin

1.2 Early Pregnancy Factor (EPF)

Alle bisher erwähnten Substanzen treten nach der Implantation auf, so daß der Embryo zwischen der Fertilisation und der Implantation in das Endometrium vor der mütterlichen Immunabwehr durch eine weitere Substanz geschützt zu werden scheint.

Morton et al. (1974) entdeckten nach Versuchen mit graviden und nichtgraviden Mäusen einen Serumfaktor, den sie später als "Early Pregnancy Factor (EPF)" bezeichneten (Morton et al. 1976).

Sie bringen diesen Faktor mit einer Beeinflussung des mütterlichen Immunsystems, vor allem auf der Basis der zellulären Reaktion während der Gravidität, in Verbindung (Morton et al. 1974 und 1976). Dieser Faktor ist bis heute ausschließlich auf indirektem Weg mit Hilfe des Rosetten-Inhibitions-Tests (RIT) nachweisbar, welcher die Fähigkeit von T-Lymphozyten ausnutzt, mit heterologen roten Blutkörperchen sogenannte Spontanrosetten zu formen.

Der Nachweis des EPF gelang inzwischen bei verschiedenen Spezies. So konnten Morton et al. (1982a) und Smart et al. (1982) beim Menschen, Morton et al. (1978) und Nancarrow et al. (1981) beim Schaf, Grewal et al. (1981), Paisley et al. (1982) und Koch und Ellendorf (1982) beim Schwein und Nancarrow et al. (1981) beim Rind EPF Aktivitäten feststellen.

Tab. 2 Nachweis und Auftreten von EPF bei Maus, Mensch, Schaf und Schwein

	frühester Nachweis	Absinken der Aktivität
Maus	4. Stunde post coitum	4. - 6. Tag
Mensch	4. Stunde post coitum	letztes Drittel der Schwangerschaft
Schaf	1. Stunde p. ovul.	14. Tag
Schwein	4. Stunde p. ovul.	kurz vor dem partus

Beim Rind wird zwischen einem maternalen (early EPF) und einem fetalen Anteil (late EPF) unterschieden.

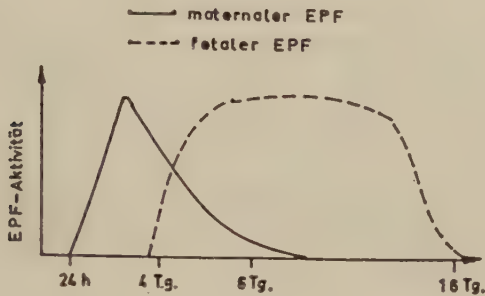


Abb. 1 Schema der Zeitbeziehungen beim Rind (basierend auf Daten von Nancarrow et al. 1981)

Von den Autoren werden folgende Anwendungsmöglichkeiten durch die Bestimmung des EPF für möglich erachtet.

- Untersuchung weiblicher Fertilitätsstörungen
- Methode zur Brunstkontrolle (genaue zeitliche Eingrenzung der Ovulation)
- Überprüfung der Zuchtleistung männlicher Tiere
- Therapie von Tumor- und Autoimmunkrankheiten

Rolfe et al. (1983) entdeckten EPF-ähnliche Aktivitäten im Serum von Mäusen die mit Seminomen behaftet waren und stellen einen Zusammenhang mit carcino-embryonalen Proteinen her. Koch (1982) fand außerdem EPF-Aktivitäten im Seminalplasma von Ebern, so daß der Nachweis des EPF als spezifisch graviditäts-assoziiertem Produkt als nicht mehr ganz gesichert angesehen werden kann. Es bedarf noch weiterführender Untersuchungen, um die Bestimmung des EPF als Frühdiagnostikum einer bestehenden Gravidität einsetzen zu können.

1.3 Erkennung und Erhaltung einer Gravidität

Der Fortbestand einer Gravidität bei Schaf und Rind ist abhängig von der Umwandlung des Corpus luteum periodicum in ein Corpus luteum graviditatis ("rescue" des Corpus luteum, Knobil 1973). Die fortgesetzte Sekretion von Progesteron aus dem Corpus luteum ist eine der wesentlichen Voraussetzungen für die Implantation, da es durch Hyperpolarisation der Myometriummzellen eine Hemmung der spontanen Uterusmotilität bewirkt. Durch Auslösung der Sekretionsphase bereitet das Endometrium die Implantation vor.

Embryotransfer - Experimente an Schafen und Rindern von Moor und Rowson (1966 a) demonstrierten, daß ein Embryo bis zum Tag 12 beim Schaf und Tag 16 beim Rind in den Uterus verpflanzt sein muß, um eine Transformation des Zyklusgelbkörpers in ein Corpus luteum graviditatis herbeizuführen. Das heißt, daß bereits Interaktionen zwischen Embryo und Mutter bestehen müssen (Heap et al. 1967).

Uteroglobulin, dem neben den immunogenen auch luteotrope Eigenschaften zugesprochen werden (Beier 1976), ist bei den domestizierten Tieren wie Schwein, Rind und Pferd nicht nachzuweisen.

HCG (Human Chorionic Gonadotropin), ein luteotropes Protein, das von der Blastozyste des Menschen produziert wird, kann ab dem 6. Tag im peripheren Plasma des Menschen nachgewiesen werden (Saxena et al. 1974). Ähnliche Hormone finden sich auch bei höheren Primaten (primate chorion gonadotropin).

PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) wird von den Endometriummzellen der Stute vom 36. Tag an sezerniert (Allen und Moor 1972). Dieser Zeitpunkt liegt allerdings so spät, daß PMSG nicht das primäre luteotrope Prinzip für eine Verlängerung der Lebensdauer des Corpus luteum darstellen kann, da das Signal für den Erhalt des C.l. vor dem 16. Tag gegeben sein muß (van Niekerk et al. 1975).

Da bei Schaf und Rind die genannten luteotropen Proteine nicht nachzuweisen sind, müssen andere Mechanismen bzw. Substanzen für die Erkennung und den Erhalt einer Gravidität und deren eventuellen Nachweis diskutiert werden.

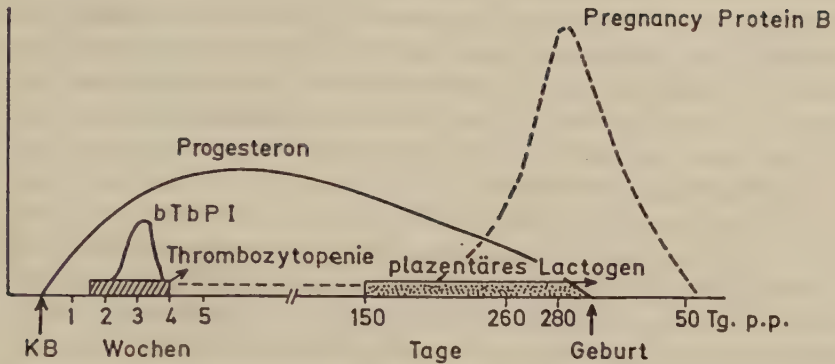


Abb. 2 Graviditätsspezifische Faktoren

bTbPI (MG 17-22000) - Aufrechterhaltung der C.L. Funktion
 - Unterdrückung der Östradiol-induzierten PGF_{2a} -Synthese

Thrombozytopenie - durch graviditätsspezifischen
 Thrombozytenaktivierungsfaktor

Pregnancy Protein B (MG 47-53000, IEP. pH 4-4.4,
 = a_1 Fetoprotein ?)

In der Uterusflüssigkeit des Rindes entdeckten Roberts und Parker (1974) geringe Mengen eines uteruspezifischen Proteins, und Laster (1977) beschreibt ein Protein, das ab Tag 15 im Uterus nachweisbar ist. Das von Thatcher et al. (1984) und Bazer et al. (1985) beschriebene Trophoblasten-Protein I, das ab Tag 16 beim Rind (bTbPI) und ab Tag 13 beim Schaf (oTbP) nachweisbar ist, soll sowohl direkt als auch indirekt, durch Unterdrückung der Östradiol-induzierten PGF_{2a} -Synthese, für die Aufrechterhaltung der Corpus luteum-Funktion verantwortlich sein.

Godkin et al. (1985) stellten bei in vitro Versuchen zwischen dem 13. und 21. Tag ein spezielles Trophoblastenprotein (oTbPl) fest, welches sich als identisch mit dem von Martal et al. (1979) beschriebenen luteotropen Prinzip herausstellte. Letztere injizierten 14 - 16 Tage alte Trophoblasten in das Uteruslumen von Schafen und konnten so eine Luteolyse über einen Monat lang verhindern.

Obwohl der antiluteolytische Mechanismus unbekannt ist, besteht die Möglichkeit einer Inhibition der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Synthese und Freisetzung. Durch den Proteincharakter des Trophoblastins erscheint es unwahrscheinlich, daß es direkt über einen "counter current" Mechanismus wirken kann. Dies wird durch die Aussage von Moor und Rowson (1966 b) unterstützt, die Schafembryonen in das isolierte kontralaterale Horn transplantierten und dabei die Luteolyse nicht verhindern konnten, so daß die Trophoblastin - Wirkung nur lokal zu sein scheint.

Mapletoft et al. (1976) beschreiben einen luteotropen Faktor, der entweder vom Embryo oder vom graviden Uterushorn gebildet wird und über einen lokalen Weg von der Uterus - Ovarvene zur Ovararterie und von dort zum Corpus luteum gelangt und eine Luteolyse verhindern kann.

Ellinwood et al. (1979) berichten über Versuche, bei denen sie Homogenate von 14 - 15 Tage alten Schafembryonen in das Uteruslumen von zyklischen Schafen infundierten und dabei eine Verlängerung der Lutealfunktion herbeiführen konnten. Sie schließen aber eindeutig aus, daß dies durch LH oder dem Prolaktin ähnliche Moleküle hervorgerufen worden sein könnte. Allerdings lassen sie die Möglichkeit einer direkten Wirkung auf das Ovar offen, obwohl sie keine vermehrte Progesteronausschüttung feststellen konnten. Dies steht im Gegensatz zu Godkin et al. (1978) und Hansel et al. (1978), die bei in vitro Versuchen mit ovinen und bovinen Embryohomogenaten sehr wohl eine Sekretion von Progesteron stimulieren konnten.

Die Vermutung von Ellinwood et al. (1979), daß es sich bei dem von ihnen beschriebenen Faktor nicht um LH oder ein Prolaktin ähnliches Protein handelt, sondern daß ein venöser - arterieller Transfer besteht, wird durch Del Campo und Ginther (1974) unterstützt, die die anatomischen Zusammenhänge zwischen Uterus - Ovarvene und Ovararterie untersuchten und dabei feststellten, daß nur kleine Moleküle diesen Weg gehen können.

Die erwähnten Autoren sehen als Hauptproblem die Diskrepanz zwischen der Struktur und der Funktion der isolierten Moleküle an.

So sieht Laster (1977) keine biologische Aktivität der beschriebenen Substanz, wohingegen Beier (1976) dem Uteroglobulin beim Kaninchen durchaus funktionelle Bedeutung in der Graviditätserhaltung beimisst.

Beim Schaf wurden weitere graviditätsspezifische Antigene identifiziert, die aber nicht mit dem Fortbestehen der Lutealfunktion assoziiert werden und deren Funktion weitgehend unbekannt ist. So beschrieben Kelly et al. (1974) ein ovines placentäres Lactogen, das zwar im ovinen Trophoblasten am Tag 16 - 17 der Gravidität vorkommt, aber nicht im Serum nachweisbar ist.

Syntheseort	Wirkungsmechanismus	Erfolgsorgan
-------------	---------------------	--------------

Konzeptus

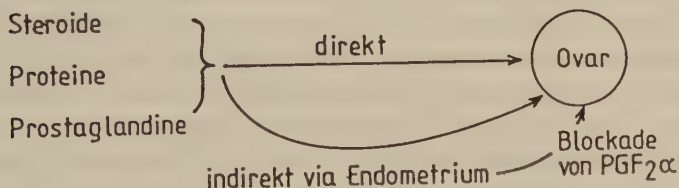


Abb. 3 Überlegungen zu möglichen lokalen Interaktionen von Ovar, Uterus und Konzeptus

Der Embryo muß beim Rind spätestens am 16. Tag dem mütterlichen Organismus seine Anwesenheit signalisieren, um eine Luteolyse zu verhindern. Das heißt, daß Prostaglandin F_{2a} , das gleichzusetzen ist mit dem luteolytischen Faktor, vom mütterlichen Organismus nicht ausgeschüttet werden darf (Moor und Rowson 1966 b).

Östradiol-17 β und Progesteron kontrollieren nach McCracken et al. (1981) indirekt die Synthese von PGF_{2a} , indem Östradiol-17 β die Bildung von Ocytocin-Rezeptoren im Uterus induziert, deren spätere Aktivierung innerhalb von Stunden die Sekretion von PGF_{2a} hervorruft. Während der Lutealphase soll Progesteron diese Östradiol-17 β Wirkung blockieren.

Die Hypothese, daß der Embryo die Synthese bzw. die Sekretion von PGF_{2a} vom Endometriumgewebe verhindert, wird konträr diskutiert.

Eine Östradiol-17 β und Progesteron-Produktion der Blastozyste wird von Gadsby et al. (1976) so verstanden, daß die Produktion sowohl vor, während, als auch nach der Implantation vorhanden ist. Diese Steroide könnten, wie von Martensz et al. (1976) vermutet, entweder sekundär eine LH - Produktion hervorrufen oder auch direkt lokal im Corpus luteum die luteolytische Wirkung des PGF_{2a} verhindern. Thorburn et al. (1973) berichten, daß PGF_{2a} -Konzentrationen im Uterusovar-Venenblut während der Gravidität geringer sind als jene während der Luteolyse. Wilson et al. (1972) vermuten das Gegenteil und Nett et al. (1976) sehen keine Unterschiede, vermuten aber, daß wohl mehr die Frequenz und weniger die absolute Konzentration der PGF_{2a} -Ausschüttung entscheidend für die Luteolyse ist. Nett und Niswender (1981) fanden ab dem 13. Tag post Östrum keine veränderten PGF_{2a} - wohl aber höhere PGF_{2a} -Konzentrationen bei graviden im Gegensatz zu nichtgraviden Schafen.

Im regelmäßigen Zyklus des Rindes erfolgen vor, während und nach der Luteolyse massive, mindestens zwei Stunden andauernde PGF_{2a} -Freisetzungen die während der Frühgravidität fehlen (Fleck 1985, Meyer et al. 1986). Inskeep et al. (1975) fanden nach intrafollikulärer Injektion von PGF_{2a} -Konzentrationen, die bei nichtgraviden Schafen luteolytisch wirkten, keine Luteolyse und vermuten einen Faktor, der während der Frühgravidität produziert wird und die Luteolyse verhindert. Mapletoft et al. (1976) meinen, daß dieser Faktor vom graviden Uterushorn gebildet wird und auf utero-ovarieriem Weg zum Ovar gelangt und dort antiluteolytisch wirkt.

Prostaglandin E_2 , das im Endometriumgewebe identifiziert wurde (Wilson et al. 1972), wird als antiluteolytischer Faktor angesehen. Es wirkt vasodilatatorisch und könnte die vasokonstriktorischen Effekte von PGF_{2a} aufheben (Bergström et al. 1968). Dies wird von Henderson et al. (1977) bestätigt. Diese Autoren infundierten beide Prostaglandine in die Ovararterie von Schafen mit regelmäßigen Zyklus und konnten dabei den PGF_{2a} -induzierten Progesteronabfall verhindern.

LH und FSH wären wohl in der Lage den Fortbestand des Corpus luteum über die normale Regression hinaus zu gewährleisten (Schallenberger et al. 1985b). Allerdings sind bei exogener Zufuhr von LH hohe, nicht physiologische Konzentrationen notwendig (Kaltenbach et al. 1968).

Karg et al. (1970) konnten bei einer Kuh mit verlängertem Zyklus von 30 Tagen einen mehrmaligen endogenen LH-Peak im Abstand von 10 Tagen feststellen. Die LH-Ausschüttung trat jeweils bei einem Abfall der Progesteron-Sekretion auf. Die Autoren vermuten daher, daß diese Freisetzung für die Aufrechterhaltung der Corpus luteum Funktion über den physiologischen Zyklus hinaus verantwortlich ist.

Nach Sasser et al. (1977) sind jedoch weder LH noch Prolaktin, noch Prolaktin und LH zusammen sind in der Lage, den luteolytischen Effekt von exogen zugeführtem PGF_{2a} zu verhindern.

Infundierte Trophoblasten- und Embryohomogenate haben ebenfalls keine Auswirkungen auf den Fortbestand des Corpus luteum graviditatis, so daß weitere Zusammenhänge für den Erhalt einer Gravidität beim Rind zu diskutieren sind.

2.1. Tierversuche

2.1.1. Versuchsplanung

Um einen möglichst umfassenden Überblick der hormonellen Veränderungen während bestimmter Reproduktionsstadien und einen Einblick in den diskontinuierlichen Charakter von Hormonfreisetzung zu erhalten, sind frequente Blutentnahmen einzelner Tiere über einen längeren Zeitraum unabdingbar.

Dies erfordert einen großen materiellen und personellen Aufwand.

Nachfolgend beschriebene Versuche sind daher von mehreren Mitarbeitern im Rahmen einer Teamarbeit am Institut in Weihenstephan durchgeführt worden.

Zwischen den Tagen 0 (Brunst) bis 36 post inseminationem müssen beim Rind wesentliche endokrine Veränderungen erfolgen, die bisher aber erst unvollständig charakterisiert wurden.

Für den Erhalt einer Gravidität sind Umstellungen sowohl in der ovariellen (Östradiol-17 β , Progesteron) als auch der uterinen Sekretion (Prostaglandine) von essentieller Bedeutung. Eine weitere nicht vollständig geklärte Frage ist die Verhinderung der Luteolyse.

Bei nicht gravid verbliebenen oder regelmäßig brünstigen Tieren ist der Auslösemechanismus und der Zeitpunkt der Luteolyse sowie eine mögliche Zyklusverlängerung auf 24 - 28 Tage nach erfolgter Insemination noch ungeklärt.

Aufgrund dieser Fragestellungen wurden zwei Versuchsreihen während der Frühgravidität durchgeführt.

a) Endokrine Veränderungen während der Tage 14 - 34 post inseminationem.

- Implantation von Vena cava- und Aorta abdominalis Kathetern und Gewinnung von Blutproben ab Tag 14 bis Tag 28 jeden zweiten Tag sechs Stunden lang alle 15 Minuten aus beiden Gefäßen. Dazu während der gesamten Versuchszeit zweistündige Blutentnahmen aus beiden Gefäßen.

b) Endokrine Veränderungen während der Tage 1 - 36 post inseminationem im Vergleich zum regelmäßigen Zyklus.

Für vorliegende Dissertation wurde primär nur der Zeitraum von 1 - 20 Tagen ausgewertet.

- Implantation von Vena cava- und Aorta abd. Kathetern entweder einen Tag vor, während oder einen Tag nach der Brunst. Eine Hälfte der Rinder sollte zu Versuchsbeginn inseminiert werden, jedes zweite Tier sollte einen Kontrollzyklus durchlaufen, danach inseminiert werden und weiter im Versuch verbleiben.

Blutentnahmen jeweils aus beiden Gefäßen alle 12 Stunden und zusätzlich alle 15 Minuten über 6 Stunden entweder an den Tagen

0 2 4 6 9 12 15 18 20 22 25

oder 1 3 5 7 10 13 16 19 21 23 26 des Zyklus bzw.
post inseminationem,

vom Tag 28 bis Tag 36 der vermuteten Gravidität zweistündige Entnahmen.

2.1.2. Tiermaterial

Alle beschriebenen Versuche wurden an der Versuchsstation "Veitshof" der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft Weißenstephan durchgeführt.

Für den ersten Versuch standen 14 Kalbinnen der Rasse "Deutsches Braunvieh" sowie 3 zugekaufte Rinder der Rasse "Deutsches Fleckvieh" und für den zweiten Versuch 11 Kalbinnen der Rasse "Deutsches Braunvieh" zur Verfügung.

Das Alter der Tiere schwankte zwischen 18 und 25 Monaten.

Die Kalbinnen des Versuchs 1 wurden bis ca. 3 Wochen vor Versuchsbeginn in einem Boxenlaufstall gehalten und bekamen Heu, Gras- und Maissilage zugeteilt, während die Tiere des zweiten Versuchs ganztägig auf der Weide gehalten wurden. Alle Tiere wurden 3 - 4 Wochen vor der geplanten Insemination in einen Anbindestall umgestallt. Die Fütterung bestand während des gesamten Zeitraums aus mit Mineralkonzentrat supplementierter Grassilage und Grummet, zusätzlich wurde ihnen ein eiweißreiches Kraftfutter vorgelegt.

Bei der tierärztlichen Eingangsuntersuchung wurden keine krankhaften Veränderungen festgestellt. Alle Tiere wiesen regelmäßige Brunstzyklen auf.

2.1.3. Versuchsdurchführung

Zur Zykluskontrolle wurden vor Versuchsbeginn im dreitägigen Turnus Blutproben durch Punktion der Vena jugularis gewonnen und im Labor mittels Radioimmuntest auf ihren Progesteron-gehalt untersucht.

Bei einer Progesteronkonzentration > 3 ng/ml Blutplasma erfolgte bei einem Teil der Tiere die Injektion eines Prostaglandin F_{2a} -Analoges (EstrumateR 2 ml = 500 μ g, i.m.) zur Luteolyseinduktion (Karg et al. 1976). Zum Teil wurde 9, 10 bzw. 11 Tage später eine zweite Injektion verabreicht, um Gruppen von 5 - 6 Tieren mit gleichem Zyklusstand zusammenzustellen.

Die künstliche Insemination erfolgte beim ersten Versuch entweder nach Brunstbeobachtung oder jeweils 72 h und 96 h nach der Luteolyseinduktion.

Von 17 inseminierten Tieren konnten 14 eindeutig als gravid eingestuft werden (positive rektale Trächtigkeitsuntersuchung nach 7 Wochen und Geburt lebender Kälber nach 270 - 303 Tagen). Ein Tier zeigte nach 21 Tagen, zwei weitere Tiere nach 25 bzw. 26 Tagen spontane Luteolyse mit nachfolgender Brunst.

Diese überprüfte Trächtigkeitsrate von 82 % wird auf die intensive Zykluskontrolle, Progesteronbestimmung, Brunstbeobachtung und auf die Eingrenzung des optimalen Besamungszeitpunktes zurückgeführt.

Beim zweiten Versuch wurden sieben Tiere analog mit zweimaligen Gaben von Estrumate^R im Abstand von elf Tagen zyklus-synchronisiert und fünf Tiere 72 h und 96 h nach zweiter Luteolyseinduktion inseminiert. Drei Tiere hatten zu Versuchsbeginn eine natürliche Brunst (Ulla, Kali, Era), wobei ein Tier (Kali) inseminiert wurde. Die vier nicht inseminierten Tiere dienten als Kontrollen.

Nach Ablauf eines Brunstzyklus (20 - 21 Tage) und neuerlicher Brunst wurden diese vier Kalbinnen ebenfalls inseminiert, dazu die drei Kalbinnen, die zu Versuchsbeginn besamt wurden, aber offenbar nicht trächtig geblieben waren.

Sechs Tiere wurden nach sieben Wochen bei rektaler Untersuchung als gravid (60 %) und vier Tiere als nichtgravid diagnostiziert. Zwei Tiere konzipierten bei zwei aufeinanderfolgenden Inseminationen nicht, wobei bei einem Tier Ovarialzysten nach rektaler Untersuchung festgestellt wurden.

Der Unterschied in der Konzeptionsrate zwischen Versuch 1 und 2 kann verschiedene Ursachen haben. Zum Beispiel die Operation um den Zeitpunkt der Brunst bei Versuch 2, zusätzliche "Stressoren" (frequente Blutentnahmen, vermehrte Unruhe im Stall) schon zum Zeitpunkt von Brunst und Ovulation und während der ersten Entwicklungszeit des Konzeptus. Beim Versuch 1 hingegen konnten die Tiere die ersten 12 - 14 Graviditätstage ungestört verbringen.

Tab. 3 Konzeptionsrate der Versuchsabschnitte

	Versuch 1	Versuch 2
Tieranzahl	17	10
Operation	12-14 Tage p. insemin.	Tag der KB + 1. Tag
Blutentnahme	ab Tag 14 p. insemin.	Tag 0 (1) p. insemin.
Konzeptions- rate	82 %	60 %

2.1.4. Operation

Am 12. Tag post inseminationem (Versuch 1) oder vor bzw. während der Brunst (Versuch 2) wurden an jeweils drei aufeinanderfolgenden Tagen je einer synchronen Gruppe Katheter implantiert.

Nach gründlichem Waschen und Scheren des Schwanzes und der Kruppe der Tiere wurde unter bestmöglichen sterilen Kautelen am sedierten (4,5 ml Combelen^R, i.m.) und anästhesierten Tier (5 ml Neocain 2 %, extradural) nach der von Walters und Schallenberg (1982) und Walters, Schams und Schallenberg (1984) beschriebenen Methode vorgegangen.

Zwischen dem 5. und 6. Schwanzwirbelsegment wird an der Ventralseite mit einem ca. 4 cm langen Schnitt die Haut eröffnet, die Arteria und Vena caudalis mediana dargestellt, inzidiert und je ein steriler, silikonisierter Vinyl-Katheter (Innendurchmesser 1 mm, Außendurchmesser 2 mm) ca. 65 - 75 cm, abhängig von der Größe des Tieres, in die Gefäße eingeführt.

Erwünscht war dabei, daß die Katheterspitzen gerade cranial der Einmündungsstellen der Venae und Arteriae ovaricae zu liegen kommen, um einen möglichst großen Anteil der Blutdrainage und der Blutzufuhr des Ovars zu erfassen.

Alle Tiere erhielten als postoperative Medikation dreimal im täglichen Abstand 20 ml Omnamycin^R i.m. (Hoechst) und durchliefen eine komplikationslose postoperative Phase ohne Temperaturerhöhung. Von den 17 operierten Tieren des ersten Versuchs konnten 13 Tiere in den Versuch genommen werden, bei 4 Tieren gelang die Katheterimplantation nicht (ausführliche Diskussion der Gründe siehe Breiting 1984).

Bei einem Tier (Ulla) mußte die Blutentnahme nach 2 Tagen wegen nicht durchgängiger Katheter abgebrochen werden. Auch durch eine Nachoperation konnte kein Blutfluß erreicht werden. Von drei anderen Tieren wurde nach 2, 6 bzw. 12 Tagen (Tyre, Ray, Kallas) der Venenkatheter entfernt, da selbst nach längerem Bemühen ebenfalls kein Blut zu gewinnen war, so daß 10 Tiere mit je 2 Kathetern und 3 Tiere mit je einem Aorta abd. Katheter die gesamte Versuchsdauer von drei Wochen wohlbehalten überstanden. Beim zweiten Versuch konnten 10 Tiere erfolgreich operiert werden, wobei allerdings bei zwei Tieren die Implantation nur eines Aorta abd. Katheters gelang.

2.1.5. Problematik objektiver Bestimmung der Position von Vena cava Kathetern

Um den Sekretionsrhythmus der Hormonausschüttung aus den Ovarien beurteilen und die korrekte Lage der Katheterspitze überprüfen zu können, werden Quotienten der Progesteronkonzentrationen zwischen simultan gezogenen Blutproben aus der Aorta abdominalis und Vena cava caud. herangezogen. Dabei sollte die Konzentration der Vena cava caud. Probe mindestens um den Faktor 5 höher sein als die der Aorta abd. (Breitinger 1984, Feck 1985, Schallenger 1985b).

Diese Methode beinhaltet eine gewisse Problematik (Abb. 4): So kann der Quotient trotz "optimaler" Katheterposition innerhalb von Minuten zwischen 1 und 10 differieren.

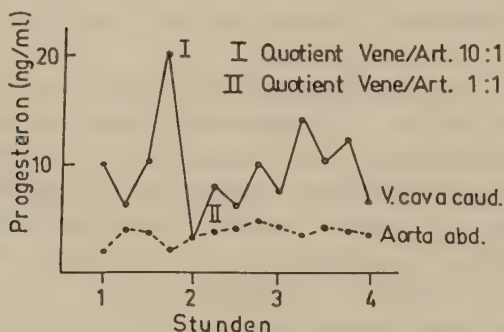


Abb. 4 Veränderung der relativen Hormonkonzentration in Vena cava und Aorta abdominalis Kathetern.

Ein Vergleich der relativen Konzentrationen ist deshalb nur sinnvoll, wenn jeweils Meßdaten von Vena cava caud. und Aorta abd. Konzentrationen, die über einen längeren Zeitraum genommen wurden, verglichen werden.

Die Quotienten der im Versuch stehenden Tiere schwankten für Progesteron von 1 : 1 bis 21 : 1, wobei Tiere, die bereits von Beginn an schlechte Katheterpositionen hatten, nachoperiert wurden, um die Position der Katheterspitze zu verändern.

2.1.6. Blutentnahme und Konservierung

Um eine Blutgerinnung in den Kathetern zu verhindern, wurden nach jeder Entnahme (6 ml) beide Katheter mit 2 - 3 ml Heparin-Lösung gespült (Konzentration 200 I.E. Rohheparin/ml phys. NaCl bei frequenten Entnahmen, 500 I.E. Rohheparin/ml phys. NaCl bei infrequenten Entnahmen und schlecht laufenden Kathetern).

Um eine bestmögliche Hygiene zu gewährleisten und Keimübertragungen von Tier zu Tier zu vermeiden, wurden für jedes Tier separate Lösungen in 250 ml Flaschen verwendet.

Nach jeder Entnahme wurden neue, sterile Einmalspritzen verwendet, die Katheter nach Beendigung der frequenten und nach jeder infrequenten Entnahme gereinigt und desinfiziert (Poly-Alkohol-Haut-Antiseptikum).

Die Hände, durch Einmalhandschuhe geschützt, wurden gewaschen und ebenfalls desinfiziert, so daß die Möglichkeit einer Erregerübertragung von Tier zu Tier vermindert wurde.

Die Richtigkeit dieses Konzeptes zeigte sich daran, daß bis zur Beendigung der 3 - 6 Wochen dauernden Versuche, kein Tier erkrankte und alle unbeschadet die Versuche überstanden.

Vor jeder Blutprobenentnahme ist zuerst das in den Kathetern befindliche Heparin-Blut-Gemisch (ca. 2 ml) zu verwerfen. Danach werden parallel mit Einmalspritzen je 6 ml Blut langsam, um Hämolyse zu vermeiden, aus den Kathetern gezogen, die Katheter mit Heparinlösung gespült und mit Verschlußknoten (Braun Melsungen AG) verschlossen. Die Proben werden vorsichtig in Polystyrolgranulat enthaltende Blutentnahmeröhrchen überführt, gemischt und sofort in einem Eis-Wasser-Bad 5 - 10 min. gekühlt. Zur Vermeidung von Prostaglandinmetabolismus werden je 100 ul "Stabilisator" in die Entnahmeröhrchen vorgelegt. Anschließend werden die Röhrchen mit einer Kühlzentrifuge bei 4°C mit 4500 Umdrehungen/Minute 20 Min. lang zentrifugiert. Das Plasma wird mit Pasteurpipetten vorsichtig unter strikter Vermeidung von Schlierenbildung abgehebert, in Plasma-Aufbewahrungsröhrchen verbracht und bei - 20°C bis zur späteren Analyse aufbewahrt.

2.2. Hormonanalytische Verfahren

2.2.1. Allgemeines

Im Rahmen dieser Arbeit wurden aus Blutplasmaproben von Rindern, die nach der oben beschriebenen Methode genommen und aufbewahrt wurden, die Konzentrationen an Progesteron, Östradiol-17 β und einiger Prostaglandine radioimmunologisch bestimmt, wobei für die Progesteron- und Prostaglandinanalysen ein sogenannter "Direkttest" Verwendung fand.

Die Validierung der Verfahren, die Voraussetzung für eine gültige Aussage ist, geschah durch Bestimmung folgender Parameter: Testsensitivität, Präzision, Parallelität von Eich- und Plasmaverdünnungskurven sowie der Wiederfindung zugesetzter bekannter Mengen von Standard und radioaktiv markiertem Hormon.

Zur Absicherung der Spezifität von Östradiol-17 β - und Prostaglandin-Bestimmungen wurde ein kombiniertes Verfahren aus HPLC und RIA verwendet.

Außerdem wurden Vorversuche mit einem Prostaglandin - Enzymimmunist durchgeführt.

2.2.2. Radioimmunist

Das Wesen eines Radioimmunistes ist die Verknüpfung hoher Nachweisempfindlichkeit radioaktiv markierter Substanzen mit der hohen Spezifität immunologischer Verfahren und ist bereits vielfach beschrieben worden (siehe methodische Grundlagen der Steroidhormontests bei Hoffmann 1977, des Progesteronnachweis bei Hoffmann, Kyrein, Ender 1973 und der Prostaglandintests bei Meyer, Enzenhöfer, Feck, in Vorbereitung 1986).

Gesamtaktivität (GA)

Die Gesamtaktivität wird bei allen durchgeführten Tests durch Zusatz von tritiummarkiertem Antigen bestimmt (keine Zugabe von nichtmarkiertem Antigen und Antikörper, keine Aktivkohlebehandlung).

Nichtspezifische Bindung (NSB)

Der Anteil markierter Substanz, der nicht von der Aktivkohle adsorbiert werden kann, wird hiermit ermittelt (keine Zugabe von unmarkierten Antigen und Antikörper). Der NSB-Wert lag zwischen 1 - 3 % der Gesamtaktivität.

O - Wert (Maximale Bindung)

Die Bindungskapazität des zugesetzten Antikörpers wird mit diesem Wert bestimmt. Um eine hohe Sensitivität der Tests zu gewährleisten, wird ein Bereich zwischen 30 und 50 % absoluter Bindung angestrebt. Dies ist stark abhängig von der Verdünnung des jeweilig verwendeten Antikörpers.

00 - und 000 - Wert

Prostaglandine stellen eine sehr instabile Stoffgruppe dar, so daß mit Abbaureaktionen, selbst bei Aufbewahrung in methanolischer Lösung bei -20°C gerechnet werden mußte. Um Falschmessungen vorzubeugen, wurden routinemäßig Eichkurvenüberprüfungen mit Hilfe der sog. 00 - und 000 - Werte vorgenommen.

Dem normalen RIA wurden zwei zusätzliche Nullwerte zugesetzt, die zweimal (00-Wert) bzw. dreimal (000-Wert) mit 0.1 ml Tritium-markiertem Prostaglandin versetzt und mit der Gesamtaktivität verglichen wurden (Berechnung der Zählausbeute und Aktivität der ^3H - Prostaglandine nach Feck 1985). Die Korrektur der Ergebnisse erfolgte bei einer Abweichung von 20 %.

Reagenzienleerwert

Um die Einflüsse der am Test beteiligten Reagenzien zu ermitteln, wurde der Reagenzienleerwert je Test bestimmt. Anstelle von Plasma wurde 1 ml H_2O bidest. verwendet. Die weitere Behandlung erfolgte analog.

Externe Wiederfindung

Um die unvermeidbaren Verluste, die bei der Extraktion von Östradiol-17 β auftreten, erfassen zu können, wurde die externe Wiederfindung ermittelt.

Je Test wurde im sechsfachen Ansatz 0.5 ml mit Aktivkohle gereinigtes Bullenplasma zusammen mit 0.1 ml 3H -Östradiol-17 β in Extraktionsgläser pipettiert und anschließend wie die anderen Proben behandelt. Gleichzeitig mit diesem Schritt wurde die gleiche Menge (0.1 ml 3H -Östradiol-17 β), in Zählküvetten mit 4 ml Xylofluor gegeben und direkt im Szintillationszähler gezählt.

Durch Vergleich der beiden Proben konnte die Wiederfindungsrate bestimmt und in die Berechnung der Östradiol-17 β - Konzentrationen mit einbezogen werden.

Tabelle 4: Schema der Progesteron - Bestimmung im Direkttest

Zugabe in ml	Eichkurve		Eichkonzentrationen(2) 5-750 pg/0.01 ml	Kontrollproben			biologische Proben und Kontrollproben
	GA	NSB		I	II	III	
Bullen-(0)-Plasma(1)	0.01	0.01	0.01	-	-	-	-
Standardverdünnungen(2)	-	-	0.1	-	-	-	-
Plasma-proben und Kontrollen	-	-	-	0.03	0.03	0.02	0.01
Gelatinepuffer	1.09	0.59	0.49	0.47	0.47	0.48	0.49
³ H-Progesteron (3)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Antiserum (4)	-	-	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Inkubations- volumen	1.2	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
Schütteln (Vortex) mind. 2 sec. Inkubation mindestens 3 Std. oder über Nacht im Eis-Wasser-Bad							
0.4 % Aktivkohle	-	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Gesamtvolumen	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	-1.2

Schütteln mind. 30 Sekunden

Inkubation: 5 Minuten bei Zimmertemperatur

Zentrifugation: 20 Minuten, 3000 U/min., 4°C

Überstand dekantieren zu 4 ml Xylofluor

Wärmebad: 67°C, 10 Minuten

Szintillationszähler

(1) 0-Plasma: Plasma ohne meßbare Progesteronkonzentration

(2) Standardverdünnungen in Gelatinepuffer

(3) ³H-Progesteron in Gelatinepuffer, ca. 10 000.cpm/0.1 ml

(4) Antiserumverdünnungen in Gelatinepuffer,

Endverdünnung: 1 : 49 000

Tabelle 5: Schema für die Östradiol-17 β - Bestimmung nach Extraktion

Zugabe in ml	Eichkurve		Eichkonzentrationen(1) 0.78-200 pg/0.1 ml	biologische Proben, Kontrollen und Reagenzienleerwerte	100 % Wert
	GA	NSB			
Extraktion:	-	-	-	0.5 - 1.0	-
Extraktionsmittel (2)	-	-	-	5.0	5.0
Horizontalerschüttler, 20 min, Ausfrieren: 2 Std. bei -60°C, Schrägstellen, Dekantieren in Zentrifugengläser, Niedertrocknen des Überstandes (Vortex- Schüttelextraktion oder Wasserbad, 60°C, Zugabe von 0.5 ml Extraktionsmittel (2) Niedertrocknen					
Standardverdünnungen(1)	-	-	0.2	-	-
Antiserum (3)	-	-	Niedertrocknen		
Gelatinepuffer	0.7	0.2	0.2	0.2	-
Schütteln (Vortex) mind. 2 Sekunden,; Inkubation: 30 Minuten, 25 °C					
³ H-Östradiol-17 β (4)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Inkubationsvolumen	0.9	0.4	0.4	0.4	0.9
Schütteln von Hand mind. 20 Sekunden,; Inkubation über Nacht im Kühlschrank, 4 °C					
0.4 % Aktivkohle	-	0.5	0.5	0.5	-
Gesamtvolumen	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9

Schütteln: 1 Minute

Inkubation: 10 Minuten bei Zimmertemperatur

Zentrifugation: 15 Minuten, 3000 U/min., 4 °C

Überstand dekantieren zu 4 ml Xylofluor

(1) Standardverdünnungen in 100 % MethOH

(2) Extraktionsmittel: Dichlormethan

(3) Antiserum in Gelatinepuffer, Endverd. 1:70000

(4) ³H-Östradiol-17 β in 100 % MethOH, ca. 5000 cpm

Tabelle 6: Schema für PGF_{2a} -, PGE_2 - und 6-keto- PGF_{1a} Bestimmungen im Direkttest (modifiziert nach Reck 1989)

Zugabe in ml	Eichkurve			B ₀			Eichkonzentrationen(2) 4-1000 fmol/0.05 ml	biologische Proben und Kontrollproben
	GA	NSB		B ₀	00	000		
0 - Plasma (1)	0.05	0.05		0.05	0.05	0.05	-	-
Standardverdünnungen(2)	-	-		-	-	-	0.05	-
Plasmaproben und Kontrollen	-	-		-	-	-		0.05
Gelatinepuffer	0.85	0.35		0.25	0.15	0.05	0.25	0.25
^3H -Prostaglandine (3)	0.1	0.1		0.1	0.2	0.3	0.1	0.1
Antiserum (4)	-	-		0.1'	0.1	0.1	0.1	0.1
Inkubationsvolumen	1.0	0.5		0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Schütteln (Vortex) mind. 2 Sekunden Inkubation im Eis-Wasser-Bad über Nacht, 4 °C,								
0.4 % Aktivkohle	-	0.5		0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Gesamtvolumen	1.0	1.0		1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Schütteln von Hand mind. 30 Sekunden Inkubation: 10 Minuten im Eis-Wasser-Bad Zentrifugation: 10 Minuten, 3000 U/min, 4 °C Überstand dekantieren zu 4 ml Rialuma Szintillationszähler								

- (1) 0 - Plasma: Plasma ohne meßbare Prostaglandinkonzentrationen
 - (2) Standardverdünnungen in 0 - Plasma
 - (3) ^3H -Prostaglandine in Gelatinepuffer, ca. 5000 cpm/0.1 ml
 - (4) Antiserumverdünnung in Gelatinepuffer
- Titer/0.1 ml: PGF_{2a} 1 : 1200, PGE_2 1 : 400, 6-keto- PGF_{1a} 1 : 6000

Tabelle 7: Schema der PGF_{2a} - Bestimmung nach Vorreinigung (modifiziert nach Feck 1985)

Zugaben in ml	Eichkurve			Eichkonzentrationen(2)			biologische Proben, Kontrollproben und Reagenzienleerwerte
	GA	NSB	B ₀	00	000	4-1000 fmol/0.1 ml	
Methanol/Phosphatpuffer (1)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	-	-
Standardverdünnungen (2)	-	-	-	-	-	0.1	-
Kartuscheneluate	-	-	-	-	-	-	0.1
³ H-Prostaglandine (3)	0.1	0.1	0.1	0.2	0.3	0.1	0.1
Einengen im Vakuum-Trockenschrank bei max. 50 °C							
Albumin-Gelatinepuffer (4)	0.5	0.5	-	-	-	-	-
Gelatinepuffer	0.5	-	-	-	-	-	-
Antiserum (5)	-	-	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Inkubationsvolumen	1.0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Schütteln (Vortex) mind. 2 Sekunden Inkubation über Nacht im Eis-Wasser-Bad							
0.4 % Aktivkohle	-	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Gesamtvolumen	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Schütteln von Hand mind. 30 Sekunden Inkubation: 10 Minuten im Eis-Wasser-Bad Zentrifugation: 10 Minuten, 3000 U/min. 4 °C Oberstand dekantieren zu 4 ml Rialuma Szintillationszähler							

(1) Methanol/Phosphatpuffer 60/40 (v/v, pH 7.2)

(2) Standardverdünnungen in 0 - Plasma

(3) ³H-Prostaglandine, ca 5000 cpm/0.1 ml, in 99 % Methanol/1 % Glycerin

(4) 0.14 % Albumin-Gelatinepuffer

(5) Antiserumverdünnung mit 0.14 % Albumin-Gelatinepuffer

2.2.2.1. Validierung der Tests

Präzision

Gültige Aussagen über ein Testsystem sind nur möglich, wenn durch solche Tests ermittelte Daten jederzeit wiederholt werden können, d.h. der Test kontrollierbar ist.

Aus diesem Grunde wurden bei jedem Test Kontrollproben, das sind Plasmaproben der gleichen Spezies mit niedriger, durchschnittlicher und hoher endogener Hormonkonzentrationen am Anfang, in der Mitte und am Ende eines jeden Tests mitbestimmt. Die Kontrollproben wurden in Aliquots, ausreichend für einen Test, abgefüllt, bei -20°C gelagert und wie die zu bestimmenden Plasmaproben jeweils bei 37°C aufgetaut und im Doppelansatz in den Test eingesetzt.

Wichtig sind die unterschiedlichen Konzentrationen der Kontrollproben, um einen Überblick über die gesamte Eichkurve zu erhalten. Die genannten Kontrollen wurden sowohl mehrmals im gleichen (Intra-assay-Variation) als auch in verschiedenen Tests (Inter-assay-Variation) verwendet. Diese Daten sind in Tab. 8 wiedergegeben.

Testsensibilität und untere Nachweisgrenzen bei unterschiedlichem Probenvolumen

Die Sensitivität eines RIA ist definiert als die kleinste nachweisbare Konzentration, hier festgelegt als 90 % Wert, die sich signifikant vom B_0 - Wert (≈ 100 % rel. Bindung) unterscheidet.

Tab 8. Inter- und Intra-assay-Variationen der verwendeten Kontrollen

Hormon	Konzentration			Inter-assay V.K.(%)	Intra-assay V.K.(%)	abs. Bindung %
	n	x	S.D.			
Progesteron ng/ml	114	0.32	0.12	15.4	8.2 $\pm$ 5.9	41.8 $\pm$ 6.8
	105	1.0	0.18	17.8	7.9 $\pm$ 4.0	
	99	4.2	0.64	15.4	4.2 $\pm$ 2.8	
	79	6.1	0.92	15.1	6.0 $\pm$ 4.2	
Östradiol-17 β pg/ml	44	17.1	3.8	22.9	6.8 $\pm$ 4.1	42.5 $\pm$ 5.7
	42	27.5	4.8	17.9	4.9 $\pm$ 3.2	
	75	39.3	4.7	12.0	7.0 $\pm$ 4.1	
	7	249.3	33.7	13.6	4.2 $\pm$ 2.7	
PGF _{2a} fmol/ml	18	240	41.9	17.1	14.8 $\pm$ 7.1	39.2 $\pm$ 11
	8	999	81.6	8.0	5.6 $\pm$ 3.0	
PGE ₂ fmol/ml	8	204	35.7	17.0	8.3 $\pm$ 7.0	28.2 $\pm$ 5.4
	8	1008	133.0	13.0	18.6 $\pm$ 9.0	
6-keto-PGF _{1a}	12	190	8.3	14.1	17.5 $\pm$ 6.4	31.6 $\pm$ 1.8
	12	913	103.0	11.0	12.2 $\pm$ 9.6	

Tab 9. Nachweisgrenzen der Radioimmuntests

Hormon	untere Nachweis- grenze	eingesetztes Plasmavolumen μ l	Aliquotfaktor zur Berechnung der Konzentration/ml
Progesteron	20 pg/ml	10	100
Östradiol-17 β	1.6 pg/ml	500	2
PGF _{2a}	80 fmol/ml	50	20
PGE ₂	80 fmol/ml	50	20
6-keto-PGF _{1a}	80 fmol/ml	50	20

Wiederfindung

Die Genauigkeit eines Tests wurde durch Zugabe bekannter Antigenkonzentrationen zu Plasmaproben und deren Konzentrationsbestimmung im RIA festgestellt und daraus die Wiederfindung berechnet.

Tab. 10 Wiederfindung(%) von zugesetzten Standardkonzentrationen zu Plasmakontrollproben und Zusätzen zur Eichkurve
Progesteron: Antiserumverd. 1:49 000

Zusatz zu Plasma pg/ml	ohne Plasmazusatz zur Eichkurve %	mit 10 ul Bullen- plasma zur Eich- kurve %	mit 100 ul MetOH zur Eichk. %
5	64	82	244
10	72	118	133
20	104	109	92
50	96	94	87
100	112	115	123
200	105	103	114
x	92.2	103.5	132.2
S.D.	19.6	13.6	57.6
V.K.	21.2	13.1	43.5
abs. Bindung	47 %	45 %	37 %

Die Spezifität der einzelnen Bestimmungsmethoden ist unter anderem abhängig von der Qualität des verwendeten Antikörpers und dessen Kreuzreaktionen mit anderen Substanzen.

2.2.2.2. Zusammenfassung der im Test verwendeten Antisera

Progesteron

Antiserum charakterisiert von Hoffmann, Kyrein, Ender (1973)
Anti-11-a-Progesteron-Hemisuccinat (an Rinderserumalbumin gekoppelt) vom Kaninchen P₂/III, Mischung vom 5.10.1976

verwendete Antiserum Verdünnung

1 : 49 000

Kreuzreaktionen	17-a-Hydroxyprogesteron	0.8 %
	Corticosteron	0.8 %
	Desoxycorticosteron	3.4 %
	Testosteron, Androstendion	
	Cortisol, Trenbolonacetat	0.2 %

Östradiol-17 β

Antiserum charakterisiert von Schallenberger, Schöndorfer, Walters (1985)
Anti-6-keto-17 β -Östradiol-6-carboxymethyloxim, konjugiert an Rinderserumalbumin vom Kaninchen Nr. E₂/II
Mischung vom 6.11.1977

verwendete Antiserum Verdünnung

1 : 35 000

Kreuzreaktionen	Östron	2.0 %
	Östradiol-17 β	0.5 %
	Östradiolbenzoat	53.0 %
	Testosteron, Diäthylstilböstrol	
	Zeranol, Trenbolonacetat	0.25%

PGF_{2a}

Antiserum charakterisiert von Enzenhöfer (1984)

verwendete Antiserum Verdünnung

1 : 2 000

Kreuzreaktionen	PGE ₂	15.5 %
	PGFM	0.8 %
	PGEM	0.01%
	6-keto-PGF _{1a}	7.1 %

6-keto-PGF_{1a}

Antiserum charakterisiert von Enzenhöfer (1984)
 verwendete Anti-
 serum Verdünnung 1 : 6 000

Kreuzreaktionen	PGF _{2a}	6.4 %
	PGE ₂	1.9 %
	PGEM	0.01%

Die Spezifität eines RIA kann nicht allein mit der Bestimmung von Kreuzreaktionen des Antikörpers ausgedrückt werden, sondern beinhaltet auch die Testung der Parallellität von Plasma-verdünnung und Standardhormon (Abb.5). Bei hoher immunologi-scher Spezifität laufen die Verdünnungen parallel, da selbst bei hohen Konzentrationen Einflüsse anderer Substanzen kaum Auswirkungen haben.

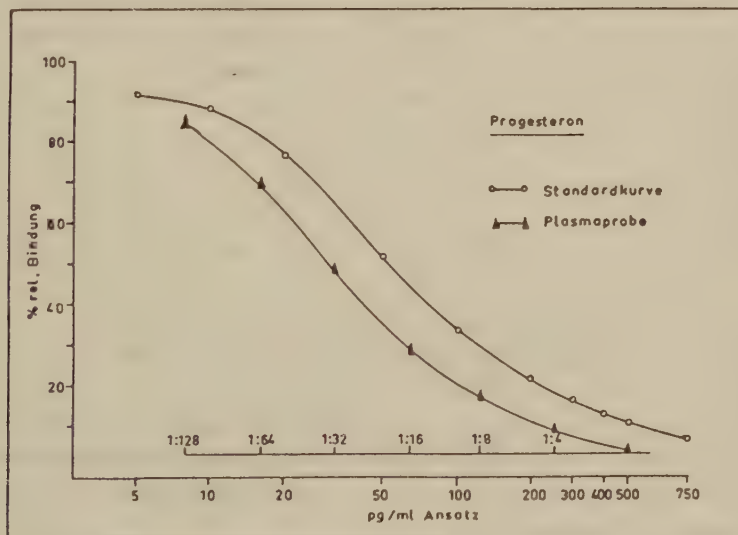


Abb. 5 Parallelität einer Plasmaprobe (z. B. Kuh F, Progesteronkonzentration 176 ng/ml, Antiserum-Verdünnung 1:49 000)

2.2.2.3. Direkttest

Die Prostaglandinbestimmungen wurden nach der von Entenhöfer (1984) und Feck (1985) beschriebenen Methode im Direkttest durchgeführt.

Für die Progesteronanalysen wurde die Brauchbarkeit eines Direkttests im Vergleich zum Verfahren mit vorgeschalteter Extraktion von Progesteron (Tab.11) überprüft.

Die Durchführung eines Direkttests ist im wesentlichen abhängig von der Spezifität und der Verdünnung des Antikörpers (Abb.7). Sie wurde durch Erstellung von Eichkurven (ohne Plasma, verschiedene Plasmaszusätze, Abb.6) und der Wiederfindung definierter Standardkonzentrationen zu Plasma (Tab.12) kontrolliert. Sehr wichtig ist die Menge des eingesetzten Plasmas (Tab.12).

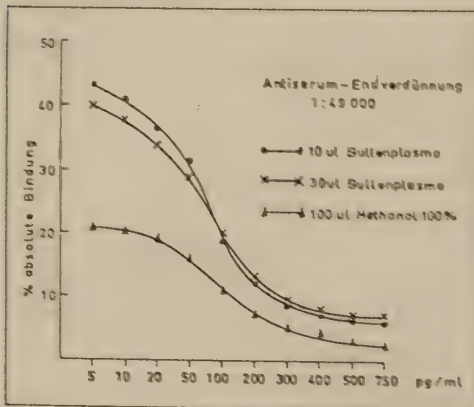


Abb. 6

Progesteron-Eichkurven mit verschiedenen Plasmaszusätzen

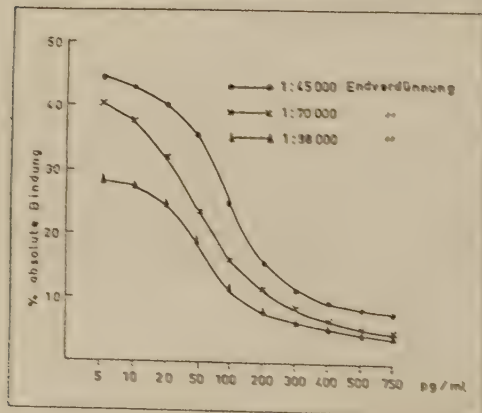


Abb. 7

Progesteron-Eichkurven mit verschiedenen Antiserumverdünnungen

Tabelle 11 Kontrollproben für Progesterontest

Kontroll- proben	nach Extraktion (mit 5 ml Petroläther) ng/ml Aliquot(µl)		Direkttest ng/ml Aliquot(µl)	
I	0.2	500	0.4	10
II	1.2	100	1.6	10
III	5.3	50	5.2	10
IV	7.4	50	6.8	10

Tabelle 12 Wiederfindung von zugesetztem Progesteron zu 3 Kontrollproben mit 1.0 ng/ml (1), 4.5 ng/ml (2) 6.5 ng/ml (3) endogenem Progesterongehalt, getestet in Aliquots von jeweils 10 und 40 µl

Progesteron zusatz ng/ml	Wiederfindung (%) des zugesetzten Progesterons					
	Kontrolle 1 40 µl 10 µl		Kontrolle 2 40 µl 10 µl		Kontrolle 3 40 µl 10 µl	
5	70	52	135	-	206	82
10	83	123	51	98	112	118
20	83	120	141	122	159	109
50	85	82	112	95	139	94
100	89	105	117	107	108	115
200	98	95	92	120	85	103
$\bar{x}$	84.7	90.4	108.0	108.4	122.8	103.5
S.D.	9.1	19.8	32.9	12.3	34.5	13.6

e Verwendung eines Aliquots von 10 µl war jener von 40 µl
utlich überlegen.

2.2.3. Radioimmunttest nach Hochleistungsflüssigkeits- chromatographie (HPLC - RIA)

Der HPLC - RIA diente der Validierung der Prostaglandin F_{2a} -Bestimmungen. Alle Bestimmungen wurden mit der gleichen Säule mit einer Durchflußrate von 1 ml/Min, bei einer konstanten Temperatur von 24.5°C durchgeführt. Die Auftragsvolumina betrugen jeweils 0.5 ml.

Ca. 5 Plasmaproben, aus verschiedenen Frühgraviditätsstadien der Kalbinnen Wera, Agathe, Fabiola, Gül und der nichtgraviden Kalbinnen Lea und Zia wurden gemischt. Daraus wurden 2 x 50 µl direkt im RIA gemessen und jeweils 1 ml Plasma mittels Methanolextraktion von Plasmaproteinen befreit und über Minikartuschen (Baker Octadecyl C_{18}) gereinigt.

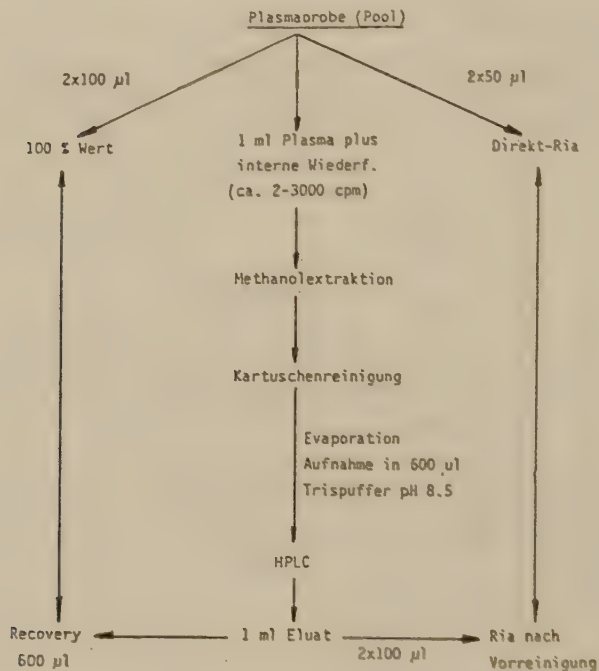


Abb. 8 Arbeitsschema für die quantitative $PGF_{2\alpha}$ -Bestimmung mittels HPLC

2.2.3.1. Methanolextraktion

Arbeitsschritte:

- Auftauen der Plasmaproben und Erstellung einer Mischprobe
- 1 ml Plasma in Reagenzglas pipettieren
- Zugabe von 1 ml H_2O und 1 ml 100 % MetOH
- Schütteln (Vortex)
- Eis - Wasser - Bad (1 - 2 h)
- Zentrifugieren (10 min. 3000 U/min. 4°C)
- Überstand in Reagenzglas dekantieren, Zugabe von 1 ml H_2O
- Sediment nachextrahieren (0,6 ml H_2O bidest. und 0,8 ml 100 % MetOH)
- Schütteln und zentrifugieren (20 min. 3000 U/Min. 4°C)
- Dekantieren zum ersten Überstand
- Aufbewahrung im Kühlschrank

2.2.3.2. Kartuschenreinigung mit Minikartuschen

Arbeitsschritte

- Überführen der Prostaglandine in einen lipophilen Zustand mit 0,2 ml 1 N HCl
- Säule reinigen mit 2 ml 100 % MetOH
- Äquilibrieren mit 2 ml 40 % MetOH
- Probe auftragen
- Waschen mit 4 ml 40 % MetOH (Eliminierung hydrophiler Substanzen von der Säule)
- Zugabe von 2 ml Trispuffer pH 8.5 (Überführung der Prostaglandine in einen hydrophilen Zustand durch pH-Veränderung)
- Eluieren mit 1 ml Methanol/Phosphatpuffer 60/40 v/v pH 7.2

Das Eluat wird mittels Evaporator bei 60°C niedertrocknet, mit 650 μ l Trispuffer (pH 8.5) wieder aufgenommen und je 500 μ l in die HPLC eingesetzt.

Die Retentionszeit von PGF_{2a} wurde durch Auftrag von 0.5 ml ^3H - PGF_{2a} auf die Auftragsschleife festgestellt. Die Fraktionszeit wurde auf 0,25 Minuten eingestellt und die Fraktionen im Fraktionssammler gesammelt. Durch die Messung der einzelnen Fraktionen im Szintillationszähler konnte die Retentionszeit festgestellt werden und dementsprechend die erste Fraktion nach 7.6 Minuten aufgefangen werden. Nach Niedertrocknen der Eluate im Trockenschrank erfolgte die Weiterbehandlung wie in Tabelle 7 angegeben.

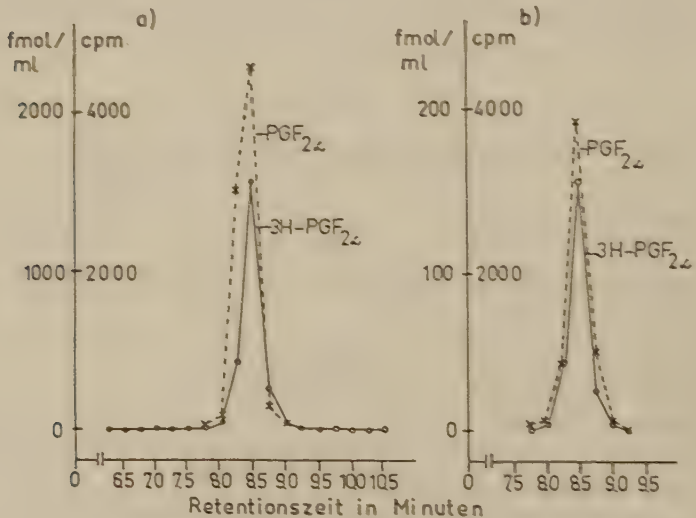


Abb. 9 Bestimmung der PGF_{2a} -Konzentration im Plasma bei 2 Kalbinnen nach Festlegung der Retentionszeit von ^3H - PGF_{2a} mittels HPLC

a) "Lea" nichtgravid, Tag 25

b) "Wera" gravid, Tag 32

Tab. 13 PGF_{2a}-Bestimmung (Vergleich Direkt-RIA/HPLC-RIA)

Konzentrations- bereich > 200 fmol/ml	Direkt-RIA fmol/ml	HPLC-RIA fmol/ml	Wdf. %
Proben von			
Grille	235	288	122
Fabiola	247	264	107
Gül	348	362	104
Wera	557	699	125
Agathe	644	590	91
Lea	3400	3404	100

Konzentrations- bereich < 200 fmol/ml	Direkt-Ria fmol/ml	HPLC-RIA fmol/ml	Wdf. %
Proben von			
Kali	106	-	-
Lotus	97	48	49
Wera	95	141	148

Während ab einem Konzentrationsbereich > 200 fmol/ml die Übereinstimmung zwischen Direkt-RIA und HPLC-Ria sehr gut ist, zeichnen sich große Unterschiede bei einem Konzentrationsbereich < 200 fmol/ml ab, was wohl auf die Annäherung an die untere Sensitivitätsgrenze der Eichkurve zurückzuführen ist.

2.2.4. Enzymimmuntest

Der Einsatz von Radioaktivität beschränkt die Durchführung eines Radioimmuntests auf wenige, speziell dafür eingerichtete Labors. Es wurde deshalb versucht, die Bestimmung von Prostaglandin F_{2a} zu vereinfachen und einem breiteren Anwendungsbereich zugänglich zu machen.

Aufgrund fehlender Radioaktivität ergeben sich eine Reihe von Vorteilen: Keine Genehmigungspflicht, keine Gefährdung durch Strahlenbelastung, keine Probleme bei der Beseitigung radioaktiven Abfalls sowie eine erhebliche Kostenersparnis.

Enzymimmunologische Verfahren sind seit der Einführung durch Engvall und Pearlmann (1971) und Van Weemen & Schuurs (1971) bereits für verschiedene Anwendungsgebiete und Stoffgruppen entwickelt worden (Schuurs & Van Weemen (1980)). Für die Progesteronbestimmung existieren mehrere EIA - Verfahren (Arnstadt und Cleere 1981, Sauer et al. 1982, Van de Wiel und Koops 1982, Munro und Stabenfeld 1984). Meyer und Güven (1986) entwickelten am hiesigen Institut einen Enzymimmuntest für Progesteron nach der Doppelantikörpertechnik auf Mikrotitrationsplatten. Außerdem beschreibt Meyer (1986, im Druck) eine Methode, mit der PGFM enzymimmunologisch in einem kompetitiven homologen Test bestimmt werden kann.

In Anlehnung an dieses Verfahren wurde versucht, die test-spezifischen Gegebenheiten auf die Bestimmung von PGF_{2a} zu übertragen.

Da es sich bei PGF_{2a} immunologisch um Haptene handelt, müssen sie, um als Vollantigene wirken zu können, an ein Proteinmolekül, z.B. Rinderserumalbumin gekoppelt werden. Wenn sich die Brücken von Antiserum und enzymmarkiertem Hormon ähneln, wird von einem homologen System gesprochen, das aber relativ unempfindlich ist, weil beim kompetitiven EIA Affinitätsunterschiede zugunsten des Konjugates auftreten (Van Weemen & Schuurs 1975, Gros et al. 1980).

Bei Verwendung unterschiedlicher Brücken zur Enzymkopplung wird von einem heterologen System gesprochen, in dem nach Hosada et al. (1981) und Read et al. (1982), die Testempfindlichkeit wesentlich gesteigert wird.

Die Kopplung von PGF_{2a} über verschiedene Brücken ist schwer zu lösen.

Um ein heterologes System zu schaffen, wurde anstatt des PGF_{2a} 15-keto-PGF_{2a} über die Carboxygruppe an die Aminogruppe des Lysins der alkalischen Phosphatase durch die gemischte Anhydrid-Reaktion gekoppelt.

Nach Rajkowski und Cittanova (1981) ist die Anhydrid-Reaktion zur Gewinnung eines stabilen, gut markierten Enzymkonjugates, mit ungeminderter Enzymaktivität und antigenen Eigenschaften gut geeignet.

2.2.4.1. Durchführung der Kopplung von PGF_{2a} und PGFM an die alkalische Phosphatase

Arbeitsschritte:

1. Herstellung von Lösung A:

- 0,25 µg PGFM in 50 µl MeOH plus 500 000 cpm (50 µl ³H-PGFM plus 2,5 µl 1 N HCl
- Niedertrocknen und Vakuum anlegen (mindestens 2 Std. bei 50 Micron in einer Gefriertrocknungsanlage)
- in 0.5 ml Dimethylformamid (DMF) lösen
- 6,25 µl Methylmorpholin zufügen und auf 0°C kühlen
- auf -15°C kühlen (20 % NaCl in Brucheis)

2. Herstellung von Lösung B:

- 100 µl alk. Phosphatase plus 400 µl H₂O
- tropfenweise 375 µl DMF zufügen und auf 0°C kühlen

3. Reaktion

- zu Lösung A 6.25 μ l Iso-buthyl-chloroformat geben, 3 min. bei -15°C rühren
- unter Rühren Lösung B dazupipettieren und sofort 20 μ l 1 N NaOH dazugeben
- mit 1 N NaOH auf pH 8.0 korrigieren
- 1 Std. bei -15°C und 2 Std. bei 0°C rühren (1/200 abnehmen und zählen)
- 10 mg NaHCO_3 zugeben, Glas mit 1 ml H_2O auswaschen

4. Separation von freiem und enzymgebundenem Hormon

- Dialyse über Nacht gegen Chromatographie-Puffer pH 7.8
- Chromatographie auf Sephadex G 25 fine mit entgastem Chromatographie-Puffer
- 2 μ l jeder Fraktion auf Mikrotitrationsplatte pipettieren und Zugabe von je 150 μ l Phosphatase-Substrat
- Messen bei 405 nm
- Fraktionen mit Enzym poolen, portionieren und bei -60°C tiefgefroren lagern

2.2.4.2. Zweidimensionale Titerbestimmung

Durch Austestung verschiedener Enzymverdünnungen 1:100 bis 1:3200 für PGFM und PGF_{2α} gegen Antiserumverdünnungen 1:2400 bis 1:20 000 für PGF_{2α} und 1:10 000 bis 1:80 000 für PGFM, wurde die geeignete Kombination von Enzym- und Antiserumkonzentrationen bestimmt und anhand der Titerkurven festgelegt.

Hormon	Enzymverd.	Antiserumverd.
PGF _{2α}	1 : 100	1 : 20 000
PGFM	1 : 100	1 : 50 000

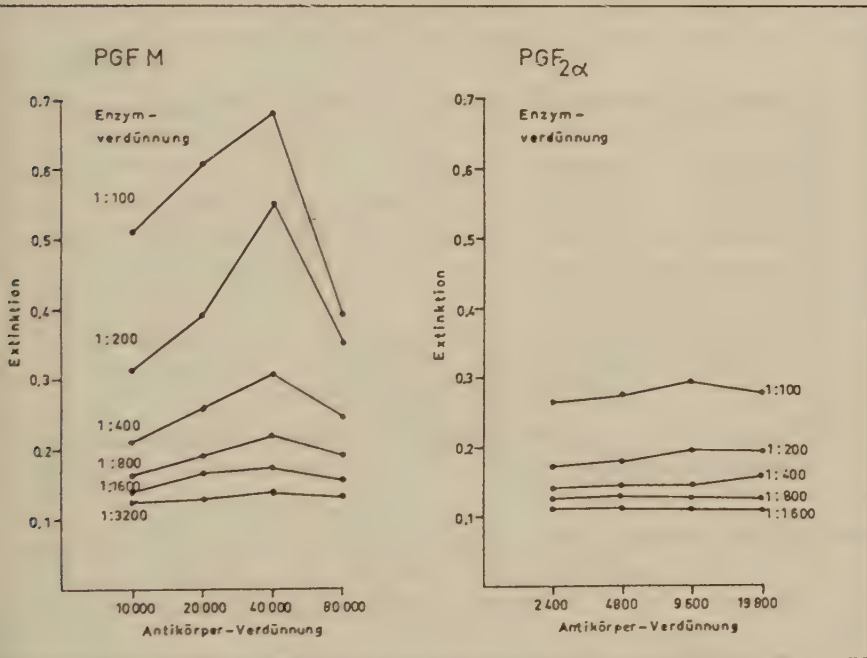


Abb. 10 Titerbestimmung von 15-keto-PGF_{2α}-Phosphatase mit PGF_{2α}-Antikörper und PGFM - Antikörper

2.2.4.3. Durchführung des EIA

Arbeitsschritte

1. Beschichtung mit Schaf Anti-Kaninchen-IgG
(2 ug/100 ul je Loch) vorverdünnt 5 mg/ml, Inkubation im Kühlraum.
2. Abkippen
3. Zweite Beschichtung mit 1 % Albumin, 300 ul/Loch
(20 min. inkubieren)
4. 2 mal waschen mit Waschlösung, 300 ul/Loch bei 4°C
5. Zugabe von Probe (2 - 20 ul) und Tracer (100 ul)
6. Zugabe von spez. Antikörper
7. Inkubation: 1 Std. bei 37°C, über Nacht bei 4°C
(leicht schütteln)
8. 4 mal waschen mit Waschlösung (4°C, 0.05 % Tween 80)
(300 ul)
9. 150 ul Substratzugabe (1mg Nitrophenylenylphosphat/ml)
1 Tablette 5 mg/ml
10. Enzymreaktion (10 min. - 2.5 Std.)
11. Stoppen mit 50 ul Phosphatpuffer (Stoppreagenz)
12. Messen bei 405 nm

2.2.4.4. Eichkurven

Für die Eichkurvenpunkte wurden die von Feck (1985) portionierten und tiefgefrorenen PGF_{2a} und PGFM Standardlösungen in einem Konzentrationsbereich von 0.78 - 200 fmol/ml verwendet, wie sie auch im RIA verarbeitet wurden.

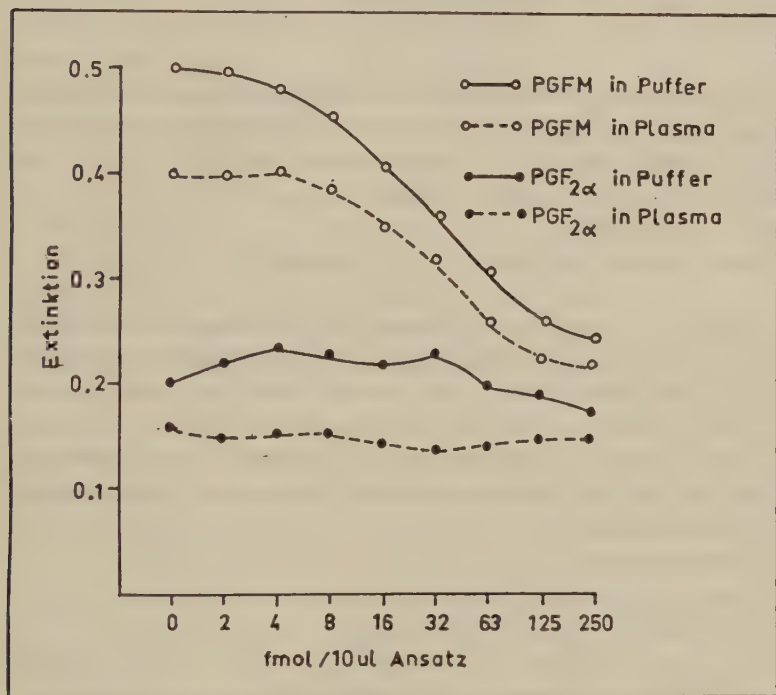


Abb. 11 EIA - Eichkurven, Vergleich PGFM mit PGF₂
Enzym: 15-keto-PGF₂ - Phosphatase

2.2.4.5. Kreuzreaktion von $\text{PGF}_{2\alpha}$ im Vergleich zu 15-keto- $\text{PGF}_{2\alpha}$

Für die Bestimmung der Kreuzreaktion von $\text{PGF}_{2\alpha}$ im Vergleich zu 15-keto- $\text{PGF}_{2\alpha}$ mit dem $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Antikörper wurden jeweils von einer Stammlösung Verdünnungsreihen angelegt. Für 15-keto- $\text{PGF}_{2\alpha}$ in einem Konzentrationsbereich von 19 bis 10 000 fmol/ml, für $\text{PGF}_{2\alpha}$ in einem Bereich von 4 bis 1 000 fmol/ml.

Von den einzelnen Standardpunkten wurden 100 μl im Doppelsatz pipettiert und nach Zugabe von 11 μl ^3H - $\text{PGF}_{2\alpha}$ im Trockenschrank niedergetrocknet. Die weitere Behandlung erfolgte analog der Prostaglandinbestimmung nach Vorreinigung wie in Tabelle 7 aufgeführt.

Die Kreuzreaktion betrug bei 50 % relativer Bindung 1.14 %.

Die schwache Bindung des 15-keto- $\text{PGF}_{2\alpha}$ an den Antikörper erklärt die ausbleibende Reaktion in der zweidimensionalen Titrierbestimmung (Abb. 10). Der Tracer kann offensichtlich nicht vom Antikörper gebunden werden.

Aus diesem Grunde wurde die Weiterführung der Versuche zur Messung von $\text{PGF}_{2\alpha}$ mit dem enzymimmunologischen Nachweisverfahren abgebrochen.

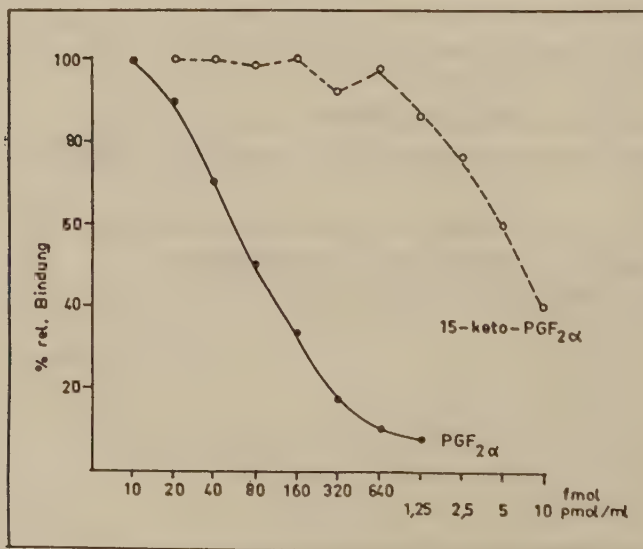


Abb. 12 Kreuzreaktion $\text{PGF}_{2\alpha}$ mit 15-keto- $\text{PGF}_{2\alpha}$

2.3. Materialien

2.3.1 Chemikalien

Methanol	Baker Chemicals 8045
Dichlormethan	Merck Nr. 6050
Salzsäure 1 N Lösung	Merck 9057
Isobuthylchloroformat	Sigma I 3253
4-Methylmorpholin	Merck 805894
N,N,-Dimethylformamid	Merck 2937
Szintillationsflüssigkeit:	Xylofluor J.T.Baker Chemicals 8589
	Rialuma J.T.Baker Chemicals 8582P

2.3.2 Biochemica

Alkalische Phosphatase	Sigma P 0405
Rinderserumalbumin	Serva 11930
Nitrophenylphosphat	Sigma 104-40 T

Radioaktiv markierte Hormone

Progesteron	1,2,6,7- ³ H-Progesteron TRK. 413, Batch 54, Amersham Int.
Östradiol	2,4,6,7,16,17- ³ H-Östradiol TRK. 587, Batch 42, Amersham Int.
PGF _{2a}	5,6,8,9,11,12,14,15(n) ³ H-PGF _{2a} TRK. 464, Batch 54, Amersham Int.
PGE ₂	5,6,8,11,14,15(n) ³ H-PGE ₂ TRK. 431, Batch 57, Amersham Int.
6-keto-PGF _{1a}	5,8,9,11,14,15(n) ³ H-PGF _{1a} TRK. 618, Batch 14, Amersham Int.
PGFM	13,14-dihydro--15-keto(5,6,8,9,11, 12,14(n))- ³ H-PGF _{2a} TRK. 517, Batch 30, Amersham Int.

Eichsubstanzen

Progesteron	Steraloids Inc. Q 2600
Östradiol-17 β	Serva 31100
PGF _{2a}	Serva 33735
PGE ₂	Serva 33733
6-keto-PGF _{1a}	Sigma Chemical Company

2.3.3 Lösungen und Puffer

Gelatinepuffer

16,34 g NaCl

1,712g NaH₂PO₄ H₂O

2.04 g Na₂HPO₄ 2 H₂O

7.44 g EDTA Titriplex III

2.0 g Gelatine

in 2 l H₂O bidest. lösen, abkühlen auf 20°C,
pH-Wert auf 7.0 einstellen

Gelatine-Albumin-Puffer 0.14 %

1,4 g Rinderserumalbumin

Gelatinepuffer pH 7.2 ad 1.0 l

Methanol/Phosphatpuffer 60/40

600 ml Methanol

320 ml H₂O bidest.

80 ml Phosphatpuffer pH 7.2

Kohlesuspension

4.0 g Aktivkohle Norit (Serva 30890)

0.4 g Dextran (Serva 18680)

H₂O bidest. ad 1,0 l

Prostaglandinstabilisator

0,3 M EDTA (Titriplex III Merck) 111,7 g
1 % Aspirin (Acetylsalicylsäure) 10,0 g
Substanzen in 200 ml H₂O bidest. aufnehmen,
pH 7,4 durch Zugabe von 15 % NaOH einstellen,
H₂O bidest. ad 1 l
aufbewahren bei Zimmertemperatur

2.3.4. Lösungen und Puffer für EIA

Coating - Puffer

4,29 g Na₂CO₃ 10 H₂O/l (Merck 6391)
2,893 g NaHCO₃ / l (Merck 6329)

PBS - Puffer

1,265 g NaH₂PO₄ H₂O (Merck 6346)
12,100 g Na₂HPO₄ 12 H₂O (Merck 6579)
8,5 g NaCl

für 2. Coating: PBS - Puffer 100 ml 1 g Albumin

Waschlösung: Twëen 80 0,5 g/l H₂O

Puffer für EIA - Enzym-Phosphatase

Assay - Puffer

20 mM Trishydroxyaminomethan	2,42 g/l
0,3 NaCl	17,52 g/l
Albumin	1,00 g/l
Stabilisator 1:200	5 ml/l

Stopreagenz

0,5 M K ₂ HPO ₄	3 H ₂ O	114,00 g/l
10 mM EDTA		3,72 g/l
	pH 10,0 mit NaOH	

Substrat - Puffer

1 M Diethanolamin 105,0 g/l

1,0 mM $MgCl_2$

1 ml aus Stammlösung (1 M $MgCl_2$ +0,1 M $ZnCl_2$)

0,1 mM $ZnCl_2$

pH 9,8 mit 1 N HCl

2.3.5 Medikamente

Estrumate ^R (Cloprostenol)	Fa. ICI Pharmaceuticals Macclesfield, GB
Combelen ^R (Chlorpromazin)	Bayer AG, Leverkusen
Merfen Orange	Zyma GmbH, München
Isotonische Kochsalzlösung	Fa. Fresenius, Bad Homburg
Poly-Alkohol-Haut-Antiseptikum	Fa. Albrecht, Aulendorf
Heparin	Fa. Diosynt, Oss, Niederlande
Chloramphenicol Susp. 20 %	Fa. Albrecht, Aulendorf
Tardomyocel ^R Comp. III	Bayer AG, Leverkusen
Neocain ^R - Lösung 2 %	Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte (WdT)

2.3.6. Materialien und Geräte

Blutentnahme-Katheter (aus Polyvinyl)	Fa. Dural Plastics & Eng. Phy. Ltd. Australien
Plasma-Aufbewahrungsröhrchen	Fa. Sarstedt
Plasma-Gewinnungsröhrchen	Fa. Sarstedt
Pipetten	Eppendorf 10 - 1000 ul
Zählküvetten	Mini-Vials, Baker Chemicals
Minikartuschen	Baker Octadecyl C 18, 1 ml, J.T. Baker Chemicals 8865
Evaporator	Vortex, Buchler
Zentrifugen	Sigma 4 K-1, Martin Christ,
Szintillationszähler	Berthold bt betazint 5000/300 Beckmann LS 7000

Tischrechner	Commodore CBM 4016
Drucker	Hewlett Packard 9871 A
RIA - Programm	Fa. Görlitz, Computerbau

EIA

Kleindispensetten 50 - 250 ul , Mikrodispenser, Modell 500
(Nichirgo)

Mikrotitrationsplatten	Immunoplate I, F - 96, Nr.4-39454 Nunc, Dänemark
------------------------	---

Mikrotitrationsplatten-Schüttler (DSG - Titertek^R)

Flow Laboratories

8 - Kanal - Photometer	(Titertek - Multiskan ^R) Typ 310 C Flow Laboratories
------------------------	---

Sephadex - Säule	Sephadex G - 25 Fine Pharmacia Fine Chemicals
------------------	--

Dialyseschlauch	Serapor ^R , 7 mm, (Sera 44142)
-----------------	---

Hochleistungsflüssigkeits - Chromatographie (HPLC)

Pumpen	"u - Flow", Beckmann 112 Solvent Delivery Module
--------	---

Säule	Altex ^R Ultrasphere ODS, 250 x 4,6 cm, RP - 18, 5 um
-------	--

Thermostat	Haake Typ FE, Karlsruhe
------------	-------------------------

Fraktionssammler	Fraction Collector, Frac 100, Pharmacia Fine Chemicals
------------------	---

3. Ergebnisse

3.1. Vorbemerkungen

Um einen besseren Vergleich der Ergebnisse von Kontrollperiode (regelmäßiger Zyklus) und Frühgravidität zu ermöglichen, werden die Daten des zeitlich später durchgeführten Experiments zuerst dargestellt, auch um eventuelle Unterschiede im Sekretionsverhalten besser aufzeigen zu können.

Um Konzentrationsunterschiede zwischen Aorta abdominalis und Vena cava caudalis eindeutig zu erfassen und mögliche testbedingte Schwankungen weitestgehend auszuschalten, wurden jeweils im selben Ansatz die zugehörigen Parallelproben bestimmt.

Weil nicht alle Einzeldaten im Rahmen der Dissertation aufgezeigt werden können, wurden die 5 der 10 Tiere des Versuchs ausgewählt, bei denen die Kurzzeitsekretionsprofile an den Tagen 0 - 20 eine repräsentative Aussage zulassen.

Auf eine Einzelerörterung mehrerer Tiere kann deshalb nicht verzichtet werden, da durch unterschiedliche Katheterpositionen nur schwer vergleichbare relative Hormonkonzentrationen resultieren.

Um eventuelle Zusammenhänge bei der Sekretion von Progesteron und Östradiol-17 β sowohl während der Frühgravidität als auch während eines Kontrollzyklus aufzuzeigen, wurden zwei Darstellungsarten angewendet.

Die Verlaufskurven von Progesteron und Östradiol-17 β sind gegenübergestellt, um einen Überblick über das Sekretionsverhalten der angesprochenen Hormone zu erhalten. Dabei wird die Differenz zwischen Basal- und Maximalwert als Amplitude und die Anzahl der kurzzeitigen Sekretionen (pulsatile Freisetzungen) pro Blutentnahmeperiode als Sekretionsfrequenz bezeichnet.

Ein Vergleich zwischen Zyklus und Gravidität ist mit der zweiten Darstellungsart versucht worden. Dabei werden die 25 Einzelkonzentrationen einer 6-stündigen Intensiventnahmeperiode gemittelt und zusammen mit der Standardabweichung, die als Maß für die Amplitude dienen kann, aufgetragen. Eine hohe Standardabweichung deutet demnach auf eine ausgeprägte Kurzzeitschwankung hin.

Bei den Untersuchungen über die Frühgraviditätstage 14 - 34 wurden ebenfalls kurzzeitige Hormonfreisetzungen gemessen, auf eine Einzeldarstellung jedoch, bis auf zwei Tiere, aufgrund der Datenfülle verzichtet. Zusätzlich zu den Intensiventnahmeperioden wurden über den gesamten Versuchszeitraum zweistündige Blutentnahmen durchgeführt, womit zwar keine pulsatilen Freisetzungen mehr gemessen, dafür aber besser Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren herausgearbeitet werden können.

3.2. Physiologische Ergebnisse der Tierversuche

3.2.1. Kurzzeitsekretion der Ovarsteroiden Progesteron und Östradiol-17 β

3.2.1.1. Brunstzyklus

Das Tier "B" wurde nach physiologischer Brunst zweimal im Abstand von 12 Std. künstlich inseminiert, nach 19 Tagen kam es erneut in Brunst und wurde wiederum besamt. Eine Trächtigkeit wurde nach 6 Wochen aufgrund rektaler Untersuchung ausgeschlossen.

Durch optimale Katheterposition, vermutlich sehr nahe der Einmündung der Venae ovaricae in die Vena cava caudalis gelegen, konnten in der Vena cava caudalis sehr hohe Progesteron- und Östradiol-17 β -Konzentrationen gemessen werden.

Die Abbildungen 13 und 14 zeigen die Sekretionsprofile von Progesteron und Östradiol-17 β an den Zyklustagen 3, 7, und 10. Die Hormonkonzentrationen in der Aorta abdominalis blieben bei Progesteron in einem Bereich von 10 ± 4 ng/ml und bei Östradiol-17 β von 8 ± 3 pg/ml. Auf eine Darstellung der Daten der Zyklustage 13 und 16 wurde ebenfalls verzichtet, weil am Tag 12 des Zyklus wohl eine Verlagerung der Position des Katheters eingetreten sein muß und so keine vergleichbaren Hormonkonzentrationen mehr verwertbar waren.

Progesteron

Durch die "optimale" Katheterposition (Verteilungseffekt sehr gering) ist der Progesteronanstieg während der ersten Zyklustage sehr gut zu verfolgen. Bereits am Tag 3 ist in der V. cava eine erste pulsatile Sekretion mit 3 Pulsen/6 Stunden festzustellen, wobei die Amplitudenhöhe 110 ± 30 ng/ml erreicht. Eine ausgeprägte Freisetzung ist am Tag 7 mit einer Amplitudenhöhe von 680 ± 330 ng/ml und einer Freisetzungsfrequenz von 5 Pulsen/6 Stunden zu erkennen. Am 10. Zyklustag bleibt die Freisetzungsfrequenz gleich, die Amplitude dagegen steigt auf 1130 ± 450 ng/ml an.

Östradiol-17 β

Die Kurzzeitsekretion ist an den Zyklustagen 3, 7 und 10 stark ausgeprägt mit konstant 5 Pulsen in 6 Stunden. Die Amplitudenhöhe, die am Tag 3 50 ± 20 pg/ml beträgt, steigt am Tag 7 auf 140 ± 60 pg/ml an und geht am Tag 10 zurück auf Konzentrationen von 35 ± 8 pg/ml.

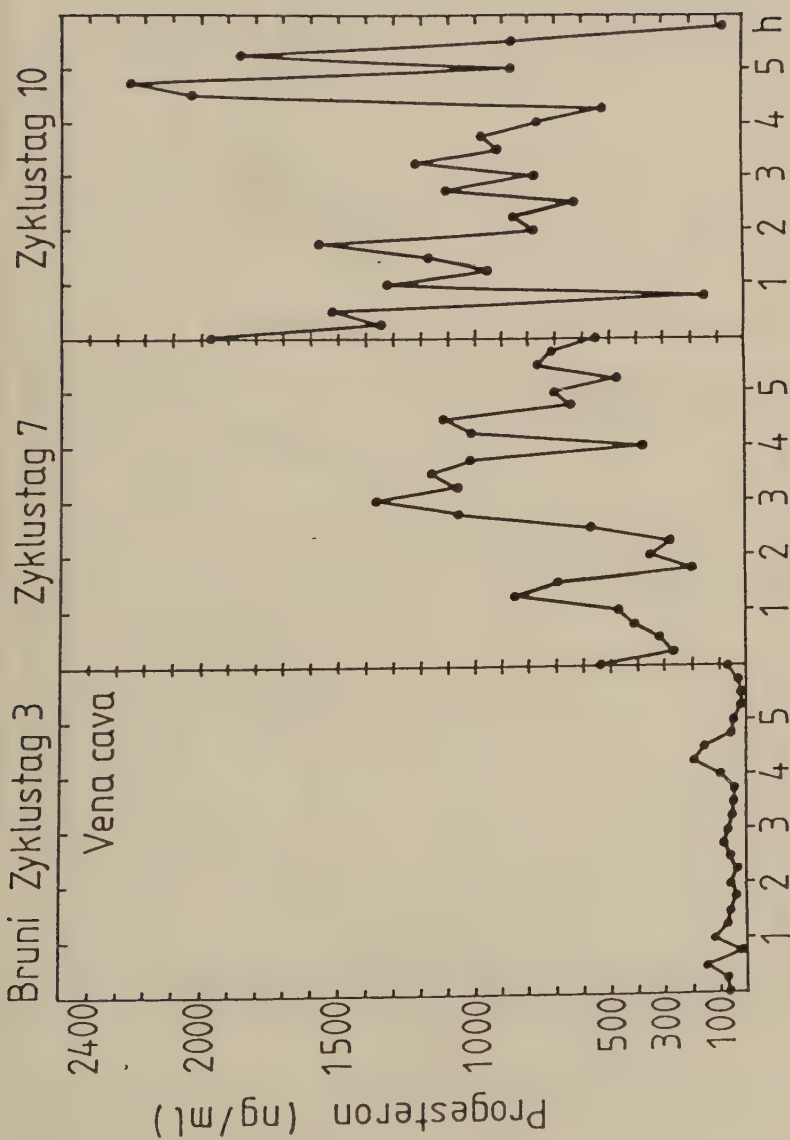


Abb. 13 Progesteron während der frequenten Blutentnahmen aus der Vena cava caud. an den Zyklustagen 3, 7, 10

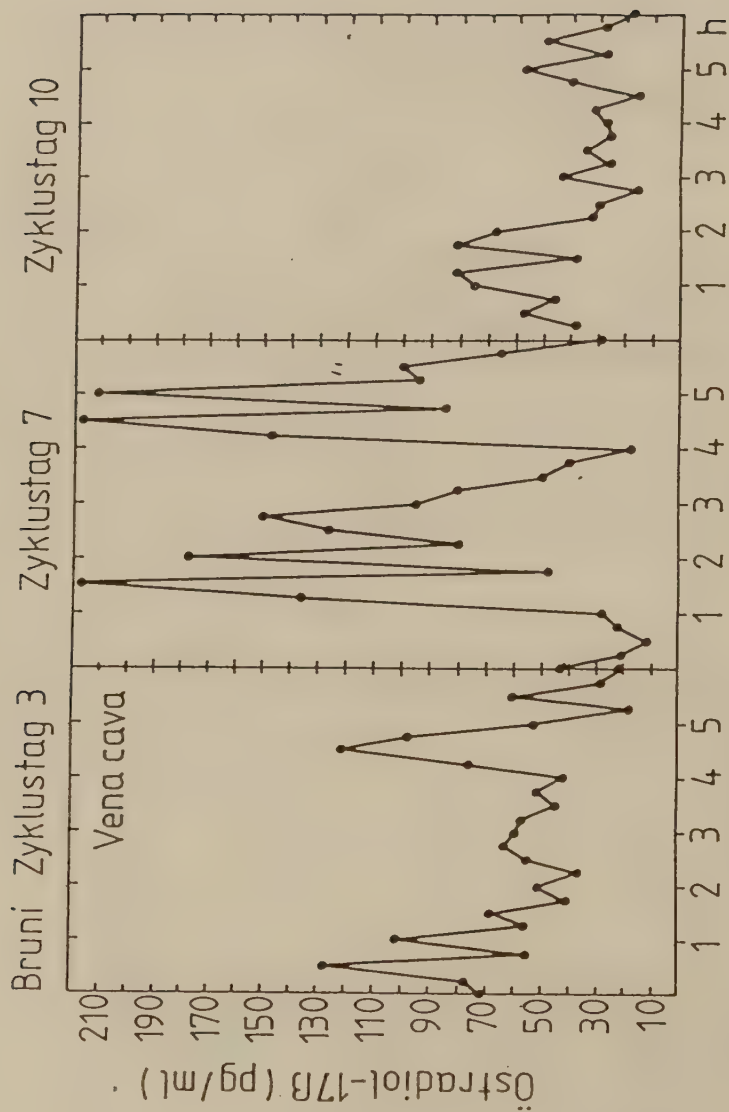


Abb. 14 Östradiol-17 β während der frequenten Blutentnahmen aus der Vena cava caud. an den Zyklustagen 3, 7, 10

3.2.1.2 Frühgravidität Tag 0 - Tag 16

Als repräsentatives Beispiel wurde das Tier "Grille" ausgewählt. Die Kalbin wurde nach Brunstinduktion zweimal künstlich inseminiert. Nach 7 Wochen konnte durch eine rektale Untersuchung eine Gravidität festgestellt werden.

Die Abbildungen 15 und 16 zeigen den Sekretionsverlauf von Progesteron und Östradiol-17 β während der Graviditätstage -1 - 16, wobei für Östradiol-17 β keine Meßdaten für den Tag 16 vorhanden sind. Der Tag 0 wird als Inseminationstag angenommen.

Progesteron

Erste pulsatile Freisetzungen gemessen in der V. cava caud. treten am Tag 5 mit 4 - 5 Pulsen in 6 Stunden auf. Die Frequenz ändert sich über den untersuchten Zeitraum von 16 Tagen nicht, wohl aber die Amplitudenhöhe, die bis zum Tag 16 stark ansteigt. Sie beträgt am Tag 5 10 ± 3 ng/ml, am Tag 7 16 ± 4 ng/ml, am Tag 10 50 ± 18 ng/ml, am Tag 13 40 ± 15 ng/ml und am Tag 16 32 ± 12 ng/ml. Gut erkennbar ist die Amplitudenhöhe anhand der Standardabweichung in Abb.17. Die Progesteronkonzentrationen in der Aorta abd. steigen vom Tag 3 kontinuierlich an und erreichen am Tag 10 ein Niveau von ca. 9 ng/ml auf dem sie bis zum Tag 16 verbleiben (Abb 17).

Östradiol-17 β

Die Abbildungen 15 und 16 geben einen Überblick über die Östradiol-17 β - Sekretionen während der ersten 13 Tage der Gravidität, wobei der Tag 0 den Inseminationszeitpunkt angibt. Auffällig ist die ausgeprägte Pulsatilität in der V. cava caud. am Tag vor der Brunst (Trächtigkeitstag -1) mit einer Amplitudenhöhe von 15 ± 7 pg/ml und 6 Pulsen/6 Stunden sowie die hohe Konzentration (9 pg/ml) in der Aorta abdominalis.

An den Tagen 1 und 3 der Gravidität ist eine pulsatile Freisetzung kaum zu bemerken (Amplitudenhöhe 5 pg/ml). Die Konzentration in der Aorta abd. sinkt auf 4 bzw. 6 pg/ml ab.

Eine erneute Ausschüttung ist am Tag 5 (Amplitudenhöhe 12 ± 5 pg/ml) und am Tag 13 (Amplitudenhöhe 10 ± 6 pg/ml) zu verzeichnen, wogegen am Tag 7 4 ± 2 pg/ml und am Tag 10 $7,5 \pm 4$ pg/ml gemessen wurden.

Einen guten Überblick über die wechselnden Amplitudenhöhen gewährt die Abb. 17 anhand der Standardabweichung.

In dieser Abbildung ist auch die wechselnde Östradiol-17 β - Konzentration in der Aorta abd. zu erkennen, die von 9 pg/ml am Tag vor der Insemination auf Werte zwischen 4 - 6 pg/ml abfällt.

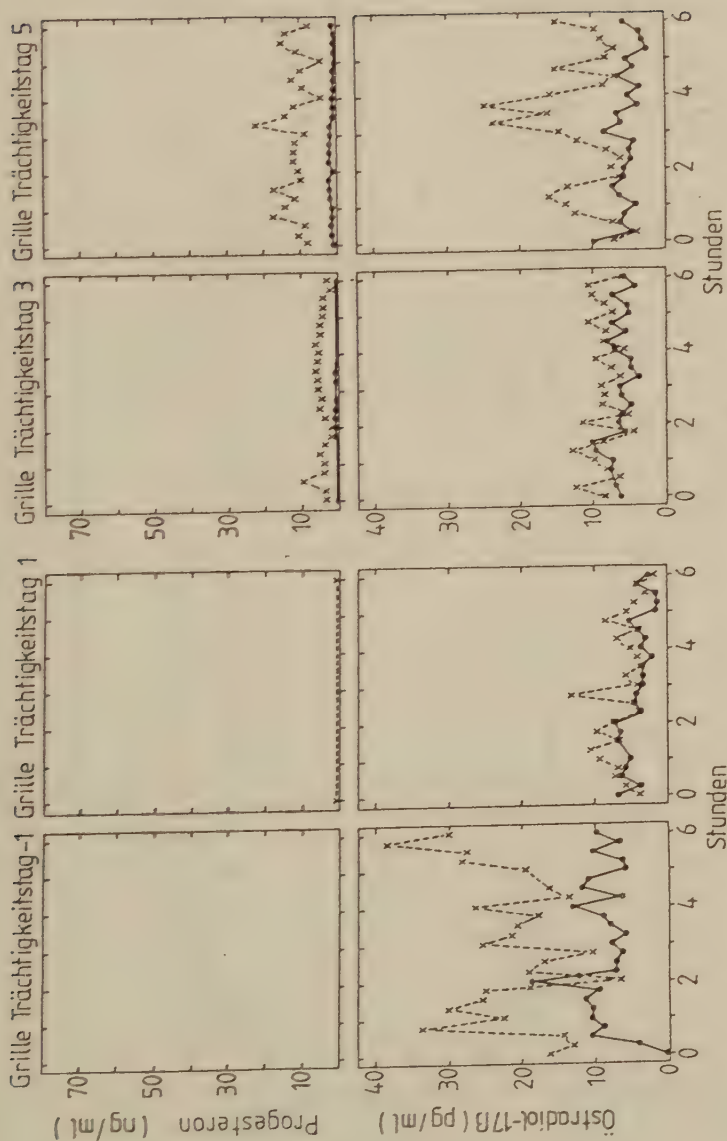


Abb. 15 Kurzzeitsekretion von Progesteron und Östradiol-17β an den Graviditätstagen -1 - 5, Kalbin Grille v. cava abd. x---x, Aorta abd. .—.

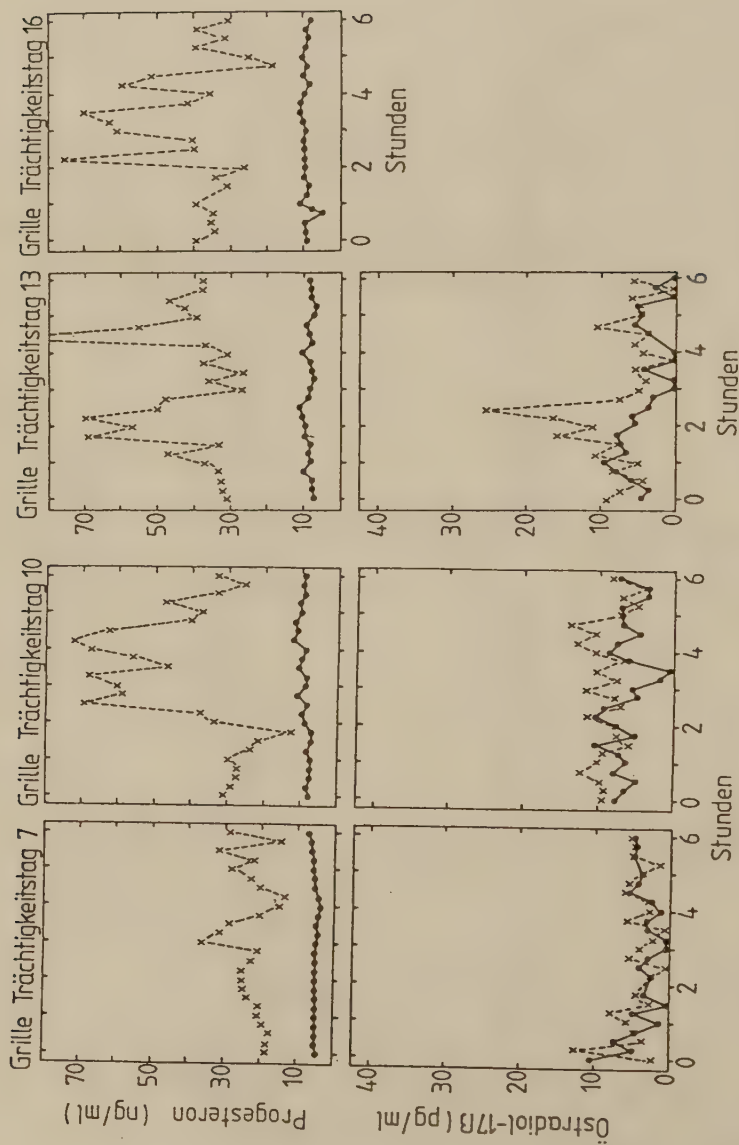


Abb. 16 Kurzzeitsekretion von Progesteron und Östradiol-17β an den Graviditätstagen 7 - 16, Kalbin Grille V. cava caud. x---x, Aorta abd. .—.

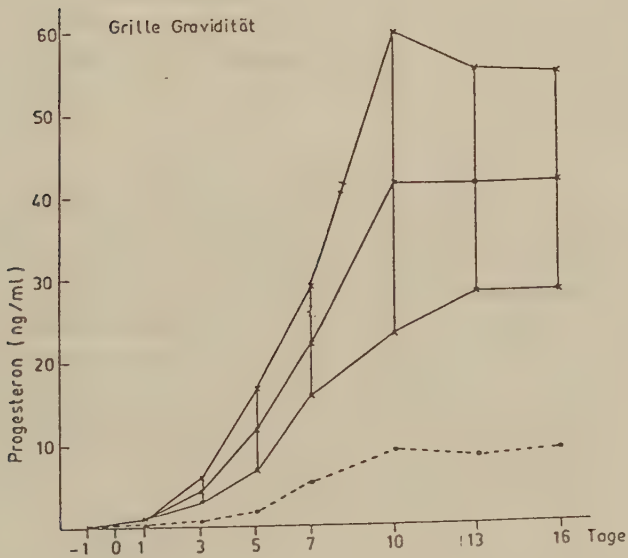
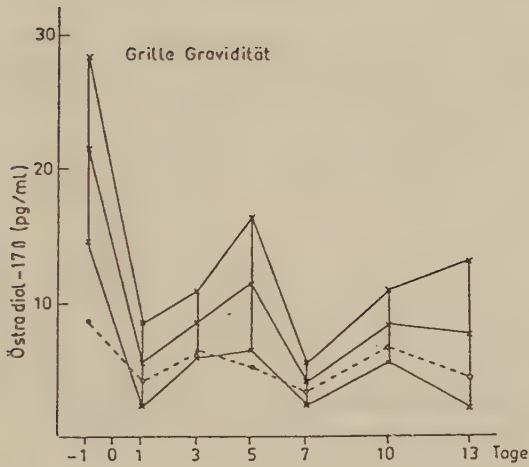


Abb. 17 Mittelwerte $\pm$ S.D. von 25 frequenten Blutentnahmen (alle 15 Min./6 Std.) der V. cava - Konzentrationen im Vergleich zu den Mittelwerten der Aorta abd.

3.2.1.3. Zusammenfassende Darstellung von Progesteron und Östradiol-17 β während der Frühgravidität (Tage 2-23)

Bei zwei weiteren graviden Tieren wurde auf eine Einzeldarstellung verzichtet. Die Abbildungen 18 und 19 zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen von Progesteron und Östradiol-17 β aus der V. cava caud. sowie die Mittelwerte der Aorta abd. Konzentrationen über einen Graviditätszeitraum von 23 Tagen (Lotus, Kali).

Auffallend bei beiden Tieren ist die ausgeprägte pulsatile Freisetzung von Östradiol-17 β am Graviditätstag 4 bzw. 5 mit einer Standardabweichung beim Tier "L" von 30 pg/ml und beim Tier "K" von 16 pg/ml (Abb. 18 u. 19). Danach fallen Mittelwerte und Standardabweichung stark ab und erreichen bei beiden Tieren am Tag 9 ein Basalniveau von 4 - 6 pg/ml.

Ein leichter Anstieg pulsatiler Sekretion ist beim Tier "L" am Tag 21 feststellbar (S.D. 5 pg/ml), dem wiederum ein Abfall auf Basalniveau folgt. Der Östradiol-17 β Verlauf in der Aorta abd. drückt diese Konzentrationsunterschiede in abgeschwächter Form aus.

Während sich die Sekretionsprofile von Östradiol-17 β bei beiden Tieren einheitlich darstellen, divergieren sie bei der Progesteronsekretion sehr stark. Während beim Tier "K" eine allmähliche Steigerung der pulsatilen Freisetzung, beginnend am Tag 2 mit einem Gipfel am Tag 9 festzustellen ist (Abb. 18), beginnt die ausgeprägte Freisetzung beim Tier "L" bereits am Tag 5, verbleibt bis zum Tag 21 in etwa auf diesem Niveau und steigt am Tag 23 wiederum stark an mit Konzentrationen um 30 pg/ml. Die Progesteronkonzentration in der Aorta abd. zeigt durchwegs leicht ansteigende Tendenz.

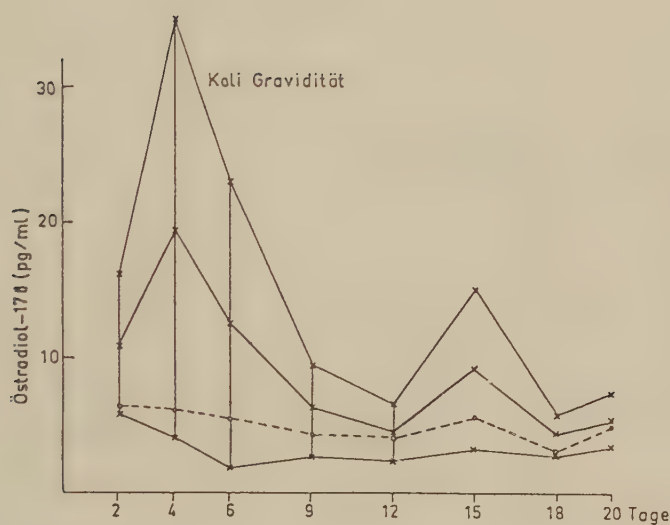


Abb. 18 Mittelwerte $\pm$ S.D. von 25 frequenten Blutentnahmen (alle 15 Min./6 Std.) der V. cava - Konzentrationen im Vergleich zu den Mittelwerten der Aorta abd.

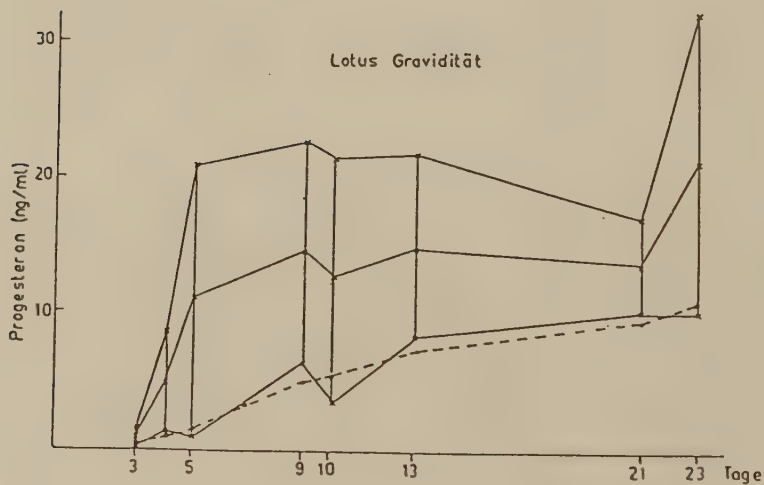
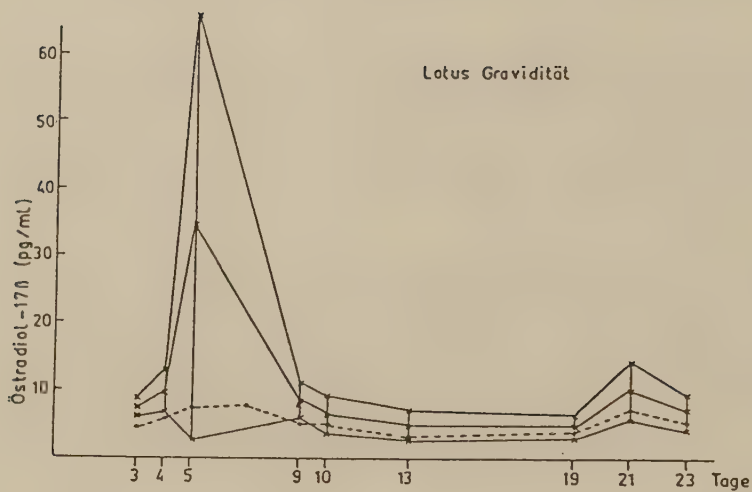


Abb. 19 Mittelwerte $\pm$ S.D. von 25 frequenten Blutentnahmen (alle 15 Min./6 Std.) der V. cava - Konzentrationen im Vergleich zu den Mittelwerten der Aorta abd.

3.2.1.4. Vergleichende Messungen in der Vena cava caud. und der Aorta abd. während des Brunstzyklus und der Frühgravidität (Tage 1 - 16)

In den Abbildungen 20 und 21 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen vergleichbarer Tage von Zyklus und Frühgravidität für Östradiol-17 β und Progesteron der Kalbin "U" dargestellt.

Frequente Blutentnahmen (alle 15 Min. über 6 Std.) erfolgten von Tag 1 - 6 in zweitägigem, ab Tag 7 in dreitägigem Abstand. Das Tier wies einen regelmäßigen Kontrollzyklus von 21 Tagen auf und wurde danach künstlich inseminiert.

Die erfolgte Konzeption konnte durch mehrmalige rektale Palpation (erstmalig nach 6 Wochen) festgestellt werden.

Bei diesem Tier ist eine detaillierte Darstellung sinnvoll, da ein unmittelbarer Vergleich zwischen Kontrollzyklus und Frühgravidität möglich ist.

Progesteron

Am Tag 3 ist Progesteron sehr niedrig (3 ng/ml) wogegen ab Tag 5 Kurzzeitschwankungen in der V. cava caud. erkennbar werden (Amplitudenhöhe 19 ± 1 ng/ml, 5 Pulse/6 Stunden) (Abb. 22).

Eine weitere Erhöhung der Amplitude auf 25 ± 5 ng/ml tritt am Tag 7 auf (Abb. 23). Die Konzentration in der Aorta abd. steigt auf 7 ng/ml an. Ein weiterer Anstieg sowohl der peripheren Konzentration (8 - 10 ng/ml) als auch der Kurzzeitsekretion (Amplitudenhöhe 27 ± 6 ng/ml) ist am Tag 9 bzw. 10 zu verzeichnen. Die Anzahl der Pulse bleibt während des gesamten Untersuchungszeitraumes konstant bei 5 - 6 in 6 Stunden.

Die höchsten Amplituden (46 ± 11 ng/ml) treten an den Tagen 12 - 13 auf, desweiteren erreicht die Konzentration in der Aorta einen Höchstwert von 12 ng/ml.

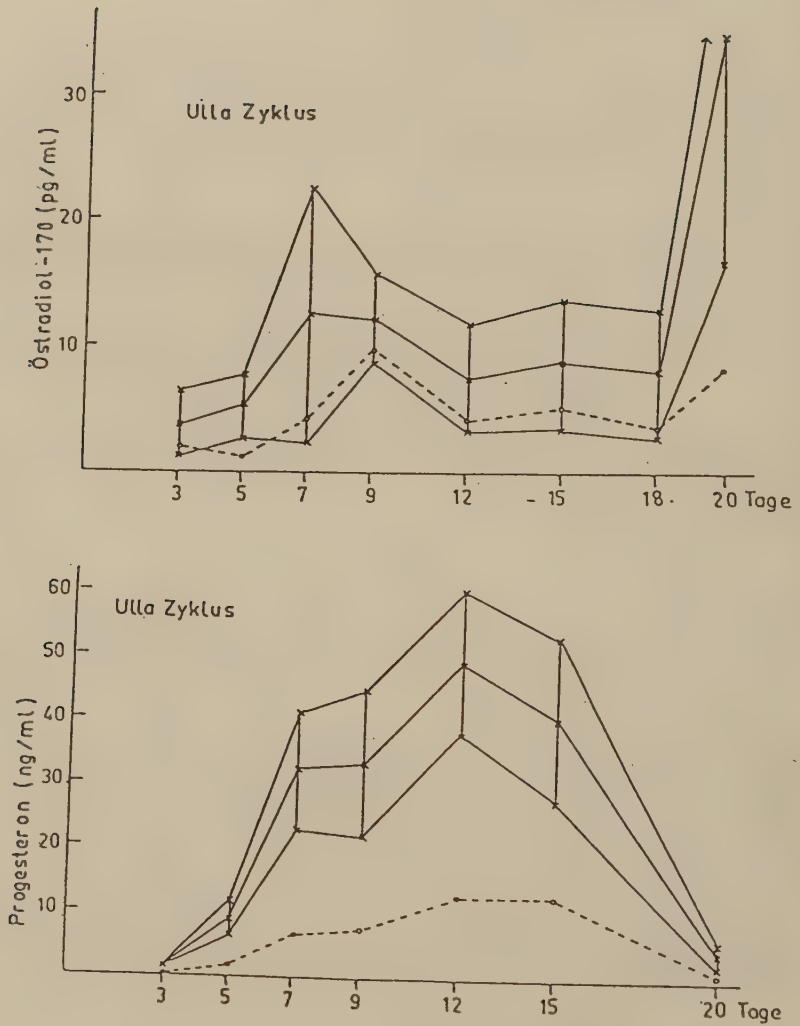


Abb. 20 Mittelwerte $\pm$ S.D. von 25 frequenten Blutentnahmen (alle 15 Min./6 Std.) der V. cava - Konzentrationen im Vergleich zu den Mittelwerten der Aorta abd. Tier "Ulla", Zyklustage 1 - 20

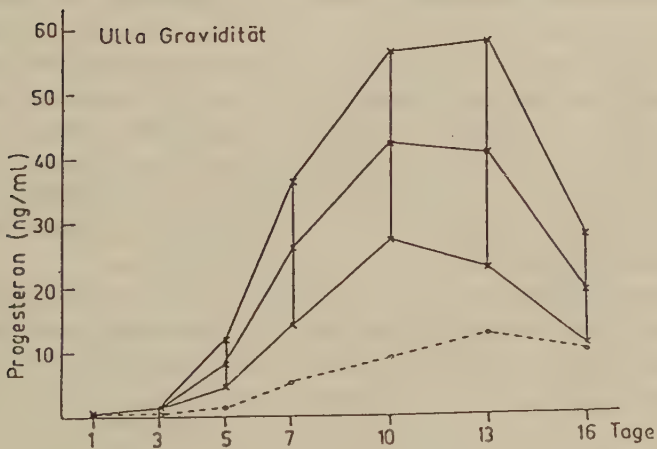
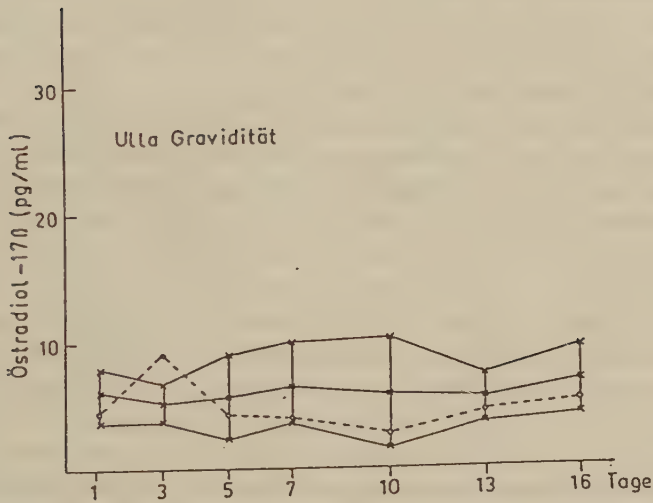


Abb. 21 Mittelwerte $\pm$ S.D. von 25 frequenten Blutentnahmen (alle 15 Min./6 Std.) der V. cava - Konzentrationen im Vergleich zu den Mittelwerten der Aorta abd. Tier "Ulla", Graviditätstage 1 - 16

Die Tage 15 - 16 sind gekennzeichnet durch einen Rückgang der Amplitudenhöhe auf 20 ± 8 ng/ml, wobei am Zyklustag 15 etwas höhere Pulse (23 ± 5 ng/ml) im Vergleich zum Graviditätstag 16 zu verzeichnen sind (Abb.24).

Bis zum Tag 16 zeigt die Progesteronsekretion ansonsten keinen Unterschied zwischen Gravidität und Zyklus.

Ab Tag 16 ist im Kontrollzyklus ein rapider Abfall der Progesteronsekretion auf Basalniveau zu sehen (Abb. 20), ein gewisser Abfall ist allerdings auch ab Tag 16 der Gravidität erkennbar (Abb.21).

Östradiol-17 β

Am Graviditätstag 3 liegen die peripheren Östradiol-17 β Konzentrationen über jenen in der V. cava gemessenen. Dieses Phänomen ist nicht erklärbar.

Interpretierbare Östradiol-17 β Sekretionen sind daher erst ab Tag 5 vorhanden. Die Frequenz der Ausschüttung beträgt 5 Pulse in 6 Stunden, die Amplitudenhöhe 6 ± 1 pg/ml. Ein Unterschied zwischen Gravidität und Zyklus ist nicht feststellbar (Abb. 22).

Der Tag 7 ist gekennzeichnet durch eine unregelmäßige Frequenz von 3 Pulsen in 6 Stunden sowohl im Zyklus als auch während der Gravidität. Die Amplitudenhöhe schwankt zwischen 8 ± 2 pg/ml in der Gravidität und 28 ± 14 pg/ml beim Kontrollzyklus. Eine Sekretionsschwankung in der Aorta von 2 - 10 pg/ml ist sowohl während der Gravidität als auch während des Zyklus festzustellen (Abb.23).

An den Graviditätstagen 10 und 13 sind keine signifikanten Unterschiede zwischen Aorta abd. und V. cava-Sekretionen vorhanden, auch sind die Kurzzeitschwankungen sehr gering ausgeprägt (Abb.23 u.24).

Am Tag 16 sind jedoch zwei unregelmäßige Pulse in 6 Stunden mit einer Amplitudenhöhe von 9 ± 5 pg/ml feststellbar. Die Zyklustage 9, 12 und 15 ergeben ein einheitliches Bild mit 3 - 4 Pulsen in 6 Stunden und einer Amplitudenhöhe von ca. 11 ng/ml. (Tag 9; 9 ± 1 pg/ml, Tag 12; 12 ± 2 pg/ml, Tag 15; 11 ± 2 pg/ml).

Die Abbildung 25 zeigt am Zyklustag 18 eine deutliche pulsatile Freisetzung mit einer Amplitude von 20 pg/ml, die Aortenkonzentration ist analog den Tagen 12 und 15 ($3 - 6$ pg/ml).

Am 20. Zyklustag können 6 Pulse in 6 Stunden und Amplituden von 32 ± 12 pg/ml festgestellt werden, die Aortenkonzentration steigt nur geringfügig auf 7 pg/ml an.

Ein Vergleich zur Gravidität kann an diesen Tagen nicht angestellt werden, da der Versuch zu diesem Zeitpunkt wegen Blutflußschwierigkeiten abgebrochen wurde.

Der Unterschied zwischen Gravidität und Zyklus besteht wohl in einer höheren Östradiol-17 β - Sekretionsrate am Tag 7 des Zyklus und einer geringeren Streuung während der Gravidität (Abb.20 u.21).

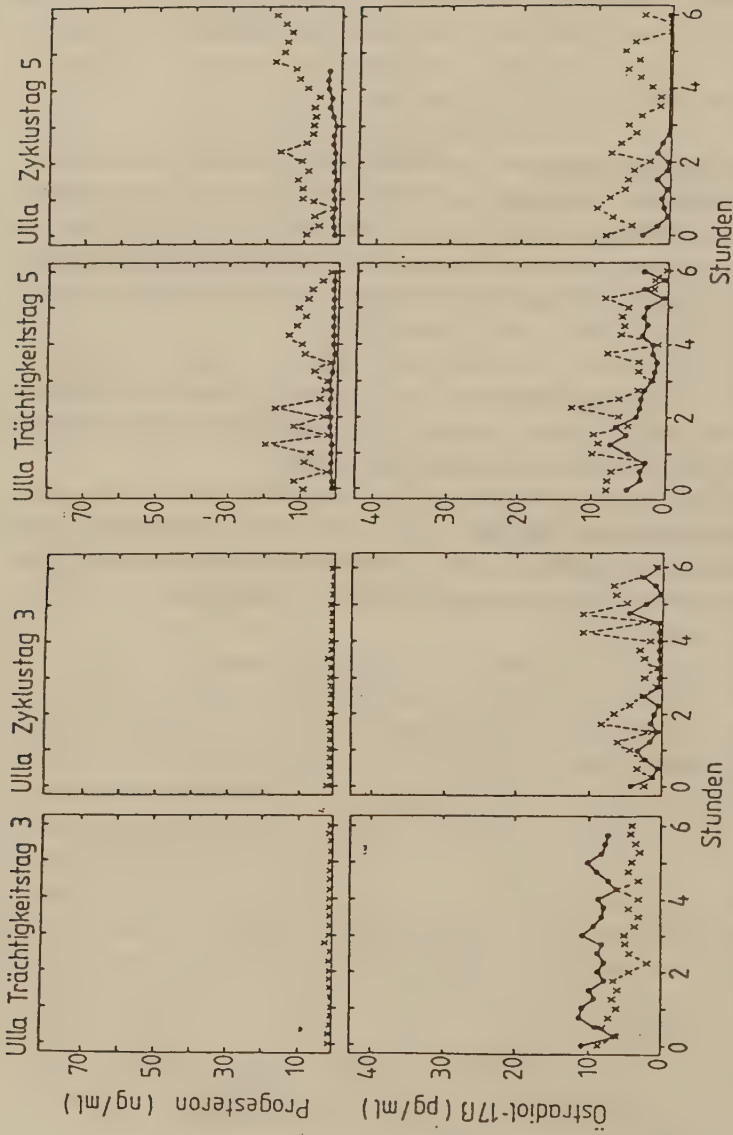


Abb. 22 Progesteron und Östradiol-17β - Kurzzeitsekretion
in der V. cava caud. x---x und Aorta abd.
Tier "Ulla", Zyklus/Graviditätstage 3 - 5

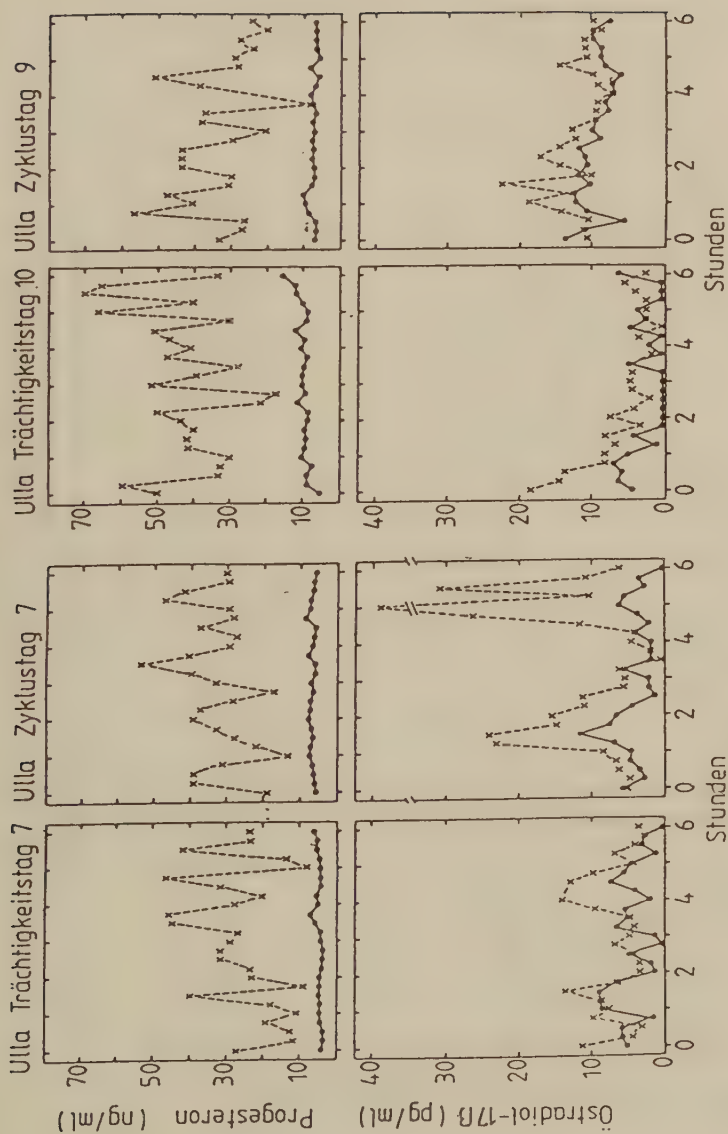


Abb. 23 Progesteron und Östradiol-17β - Kurzzeitsekretion in der V. cava caud. x---x und Aorta abd. —. Tier "Ulla", Zyklus/Graviditätstage 7 - 10

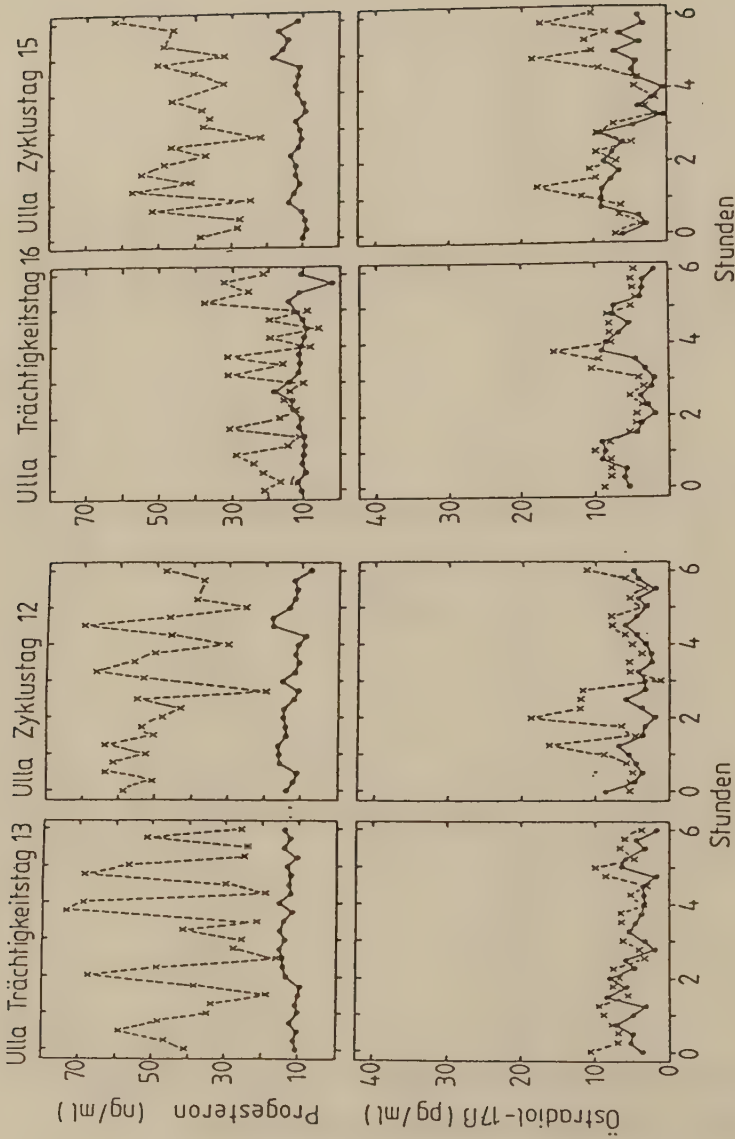


Abb. 24 Progesteron und Östradiol-17β - Kurzzeitsekretion in der V. cava caud. x---x und Aorta abd. .----. Tier "Ulla", Zyklus/Graviditätstage 12 - 16

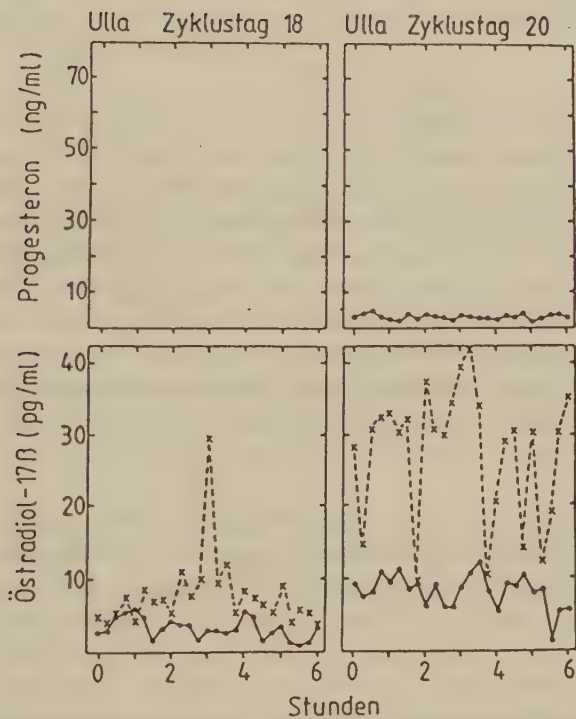


Abb. 25 Progesteron und Östradiol-17β - Kurzzeitsekretion in der V. cava caud. x----x und Aorta abd. —. Tier "Ulla", Zyklustage 18 - 20

3.2.2.1. Vergleichende Konzentrationsmessungen der Ovarsteroid- und von Prostaglandin F_{2a} in der Vena cava caud. während der Frühgravidität und während des Brunstzyklus (Tage 14 - 31)

Um Unterschiede im Sekretionsverhalten von PGF_{2a}, Östradiol-17 β und Progesteron zwischen einem graviden und einem zwar inseminierten, aber nicht graviden oder nicht gravid verbliebenen Tier mit verlängertem Zyklus (27 Tage) herauszuarbeiten und aufzuzeigen, wurden die Konzentrationen in der Vena cava caudalis zweier repräsentativer Tiere gegenübergestellt.

Die Abbildungen 26 - 32 zeigen Profile der angesprochenen Hormone von "Wera" (gravid) und "Zia" (nicht gravid, bzw. nicht gravid geblieben), an den Tagen 14, 16, 18, 20, 24, 28 und 31.

Am Tag 14 sind auffallende Unterschiede nur bei PGF_{2a} festzustellen. Während bei "W" die Konzentrationen um die Nachweisgrenze von 80 fmol/ml schwanken und nur teilweise 200 fmol/ml erreichen, ist das Niveau bei "Z" um ca. 300 fmol/ml höher (Amplitudenhöhe 200 ± 50 fmol/ml, 6 Pulse in 6 Stunden).

Kurzzeitige Ausschüttungen von Östradiol-17 β sind an diesem Tag nicht zu unterscheiden (Niveau, 8 - 15 pg/ml), wohingegen bei "W" höhere Amplituden von Progesteron (40 ng/ml) im Gegensatz zu "Z" (20 ng/ml) zu verzeichnen sind. Am Tag 16 kann beim graviden Tier kaum PGF_{2a} festgestellt werden, beim nicht-graviden liegen ebenfalls nur geringe Konzentrationen (100 - 200 fmol/ml) vor. Östradiol-17 β bleibt bei beiden in einem Bereich zwischen 4 - 15 pg/ml. Auffallend ist die frequente Progesteronausschüttung beim Tier "W" mit einer Amplitude bis 400 ng/ml (durchschnittlich 150 - 80 ng/ml) (Abb. 27).

Die Amplituden der Progesteronsekretion des graviden Tieres "W" sind am 18. Tag wesentlich kleiner (6 Pulse/6 Stunden, Amplitudenhöhe 43 ± 15 ng/ml). Das nicht gravide Tier "Z" weist ähnliche Kenndaten auf (3 Pulse/6 Stunden, Amplitudenhöhe 18 ± 8 ng/ml).

PGF_{2a} ist beim graviden Tier konstant niedrig, wogegen beim nichtgravidem Tier 3 kleine Freisetzung (Amplitude 80 fmol/ml) gesehen werden.

Es liegen keine Unterschiede in der Östradiol-17 β Sekretion zwischen gravidem und nichtgravidem Tier vor (Abb. 28).

Eine pulsatile Freisetzung von Progesteron tritt am Tag 20 beim graviden Tier auf, (5 Pulse/6 Stunden, Amplitudenhöhe bis 600 ng/ml; durchschnittlich 290 ± 270 ng/ml), während bei der nichtgravidem Kalbin 2 Pulse/6 Stunden mit einer Amplitudenhöhe von 20 ± 8 ng/ml auffallen.

PGF_{2a} ist bei "W" nicht nachweisbar, bei "Z" sind 3 kleine Pulse mit einer Amplitudenhöhe von 200 fmol/ml zu verzeichnen. Östradiol-17 β schwankt in einem Bereich von 5 - 20 pg/ml bei beiden Tieren (Abb.29).

Die hohen PGF_{2a}-Ausschüttungen (2500 fmol/ml) am Tag 24 bei der Kalbin "Z" deuten auf eine beginnende Luteolyse hin (Abb. 30).

Die Östradiol-17 β Konzentrationen steigen stark an (4 Pulse/ 6 Stunden, Amplitude 16 ± 6 pg/ml), die Konzentration von Progesteron hingegen fällt auf einen Bereich von 5 ng/ml ab, eine pulsatile Sekretion ist nicht mehr feststellbar.

Bei der Kalbin "W" treten am Tag 24 kaum PGF_{2a} -Freisetzungen auf (Amplitude 100 fmol/ml), Östradiol-17 β steigt auf 30 pg/ml an und bei Progesteron ist eine sehr starke Kurzzeitfreisetzung (6 Pulse/6 Stunden) hoher Amplitude (245 ± 140 ng/ml) vorhanden.

Die Kalbin "Z" hatte am Tag 27 deutliche Brunstsymptome und wurde erneut künstlich inseminiert.

Eine PGF_{2a} -Sekretion ist beim graviden Tier kaum vorhanden (1 Freisetzung/6 Stunden, 100 fmol/ml Amplitude), wogegen die Östradiol-17 β Konzentration auf 30 pg/ml ansteigt (Abb.31). Eine ausgeprägte Kurzzeitsekretion ist bei Progesteron sichtbar (4 Pulse/6 Stunden, Amplitude 170 ± 80 ng/ml).

Der Tag 31 der Gravidität ist gekennzeichnet durch eine ausgeprägte Kurzzeitsekretion von PGF_{2a} , Östradiol-17 β und Progesteron (Abb.32).

Die PGF_{2a} -Konzentrationen weisen eine Amplitudenhöhe von 450 ± 200 fmol/ml und eine Freisetzungsfrequenz von 6 Pulsen/6 Stunden auf. Östradiol-17 β bewegt sich auf einem Niveau von 25 - 47 pg/ml und die Progesteronamplituden erreichen eine Höhe von 800 ng/ml bei 5 Pulsen in 6 Stunden.

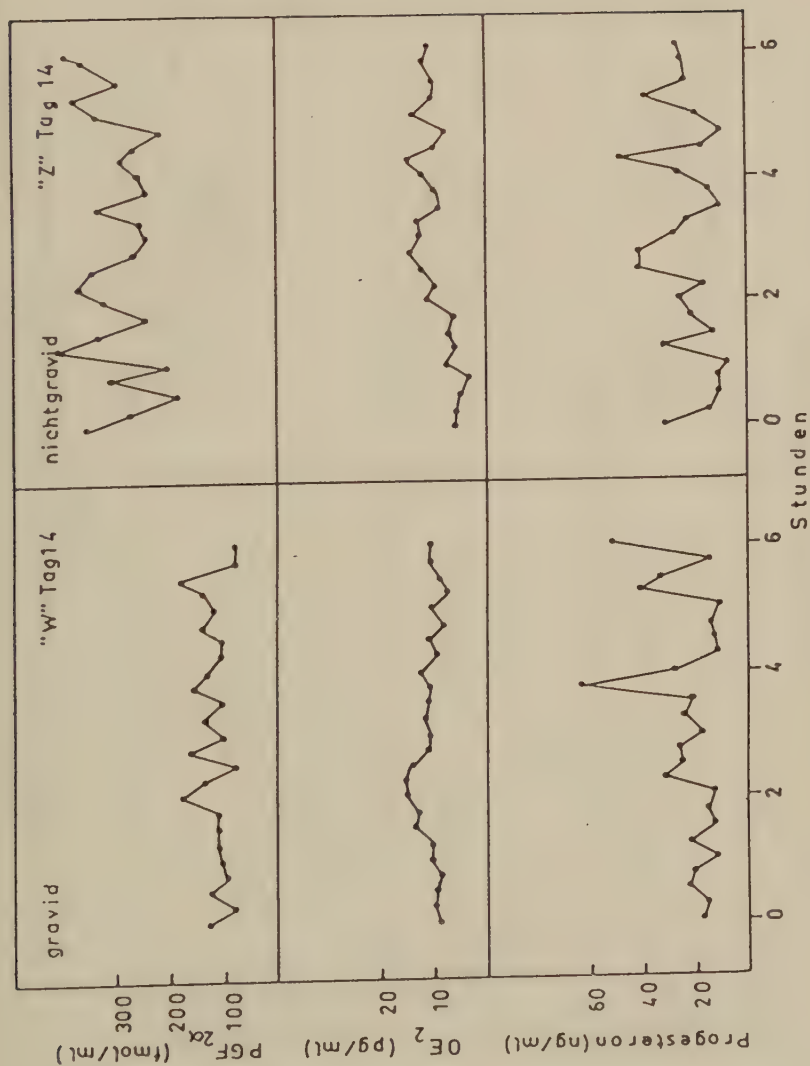


Abb. 26 Vergleich der PGF_{2α}-, Östradiol-17β- und Progesteron-Sekretion je einer graviden ("W") mit einer inseminierten aber nichtgraviden Kalbin ("Z") Tag 14

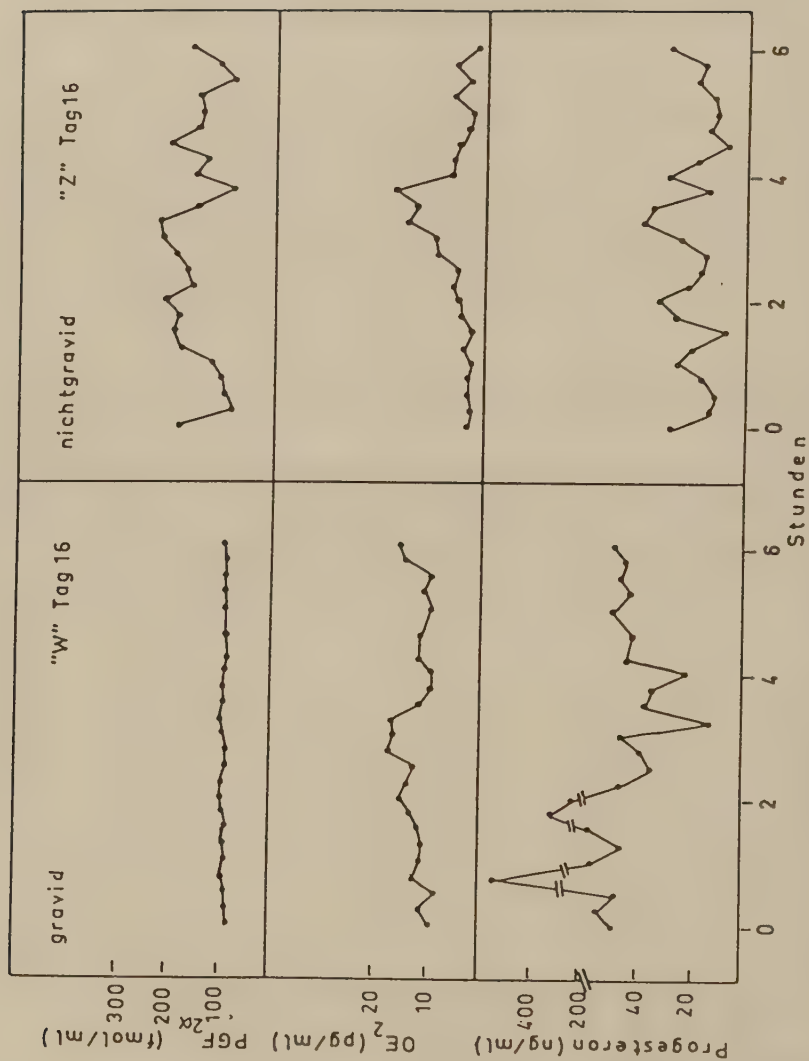


Abb. 27 Vergleich der PGF_{2α}-, Östradiol-17β- und Progesteron-Sekretion je einer graviden ("W") mit einer inseminierten aber nichtgraviden Kalbin ("Z") Tag 16

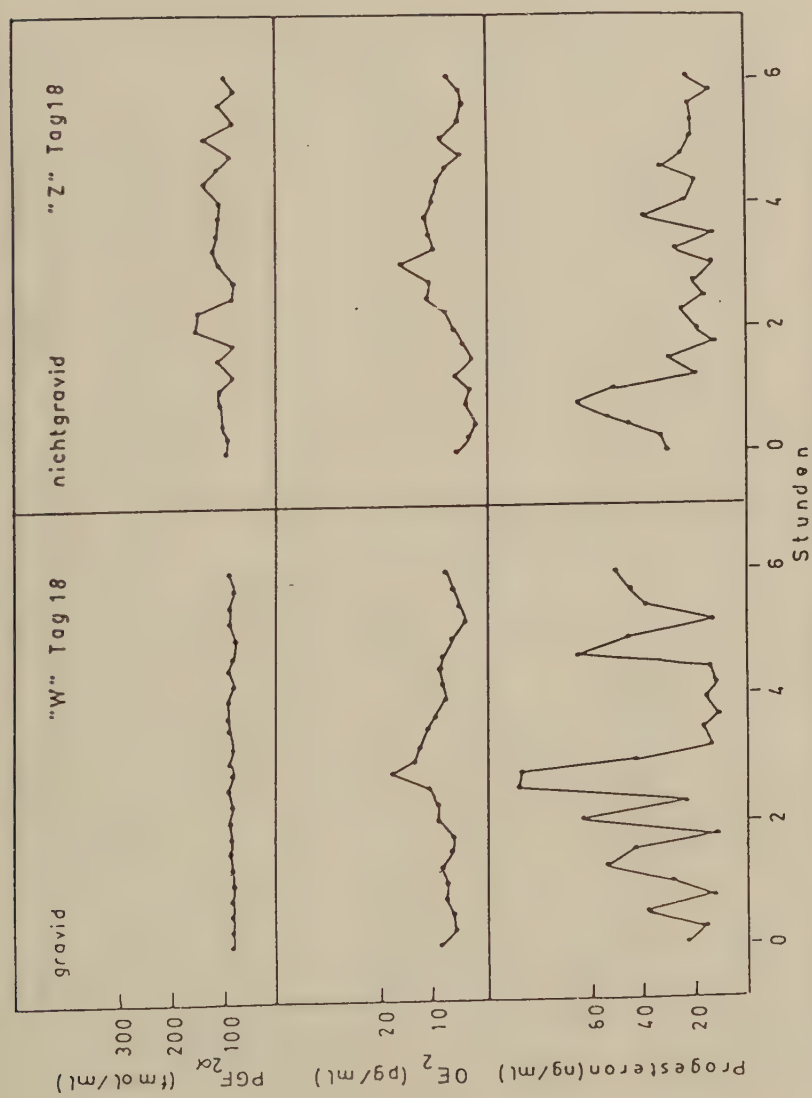


Abb. 28 Vergleich der PGF_{2α}-, Östradiol-17β- und Progesteron-Sekretion je einer graviden ("W") mit einer inseminierten aber nichtgraviden Kalbin ("Z") Tag 18

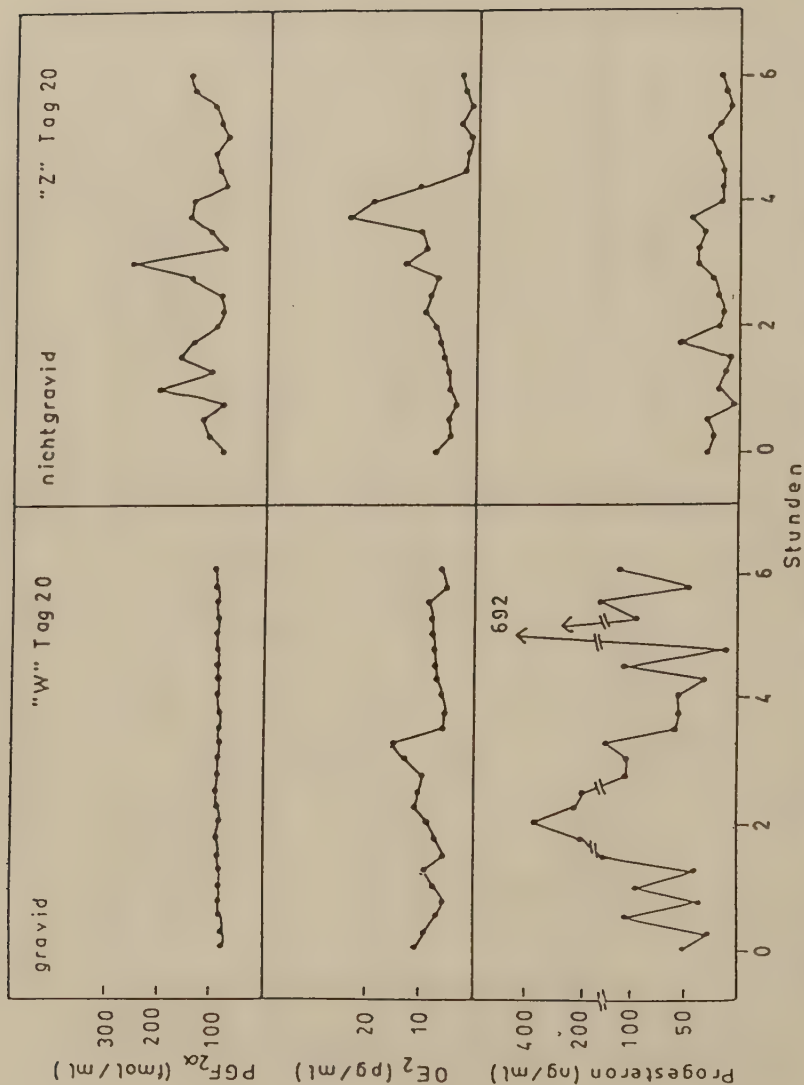


Abb. 29 Vergleich der PGF_{2α} -, Östradiol-17β- und Progesteron-Sekretion je einer graviden ("W") mit einer inseminierten aber nichtgraviden Kalbin ("Z") Tag 20

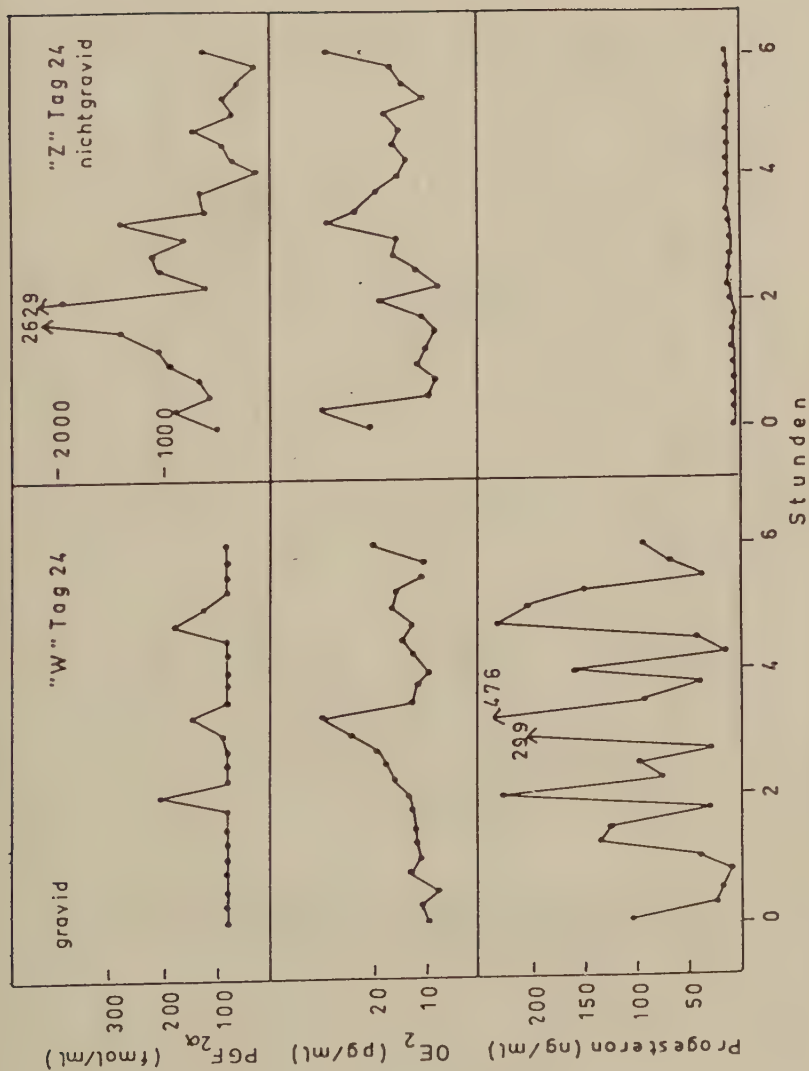


Abb. 30 Vergleich der PGF_{2α} -, Östradiol-17β- und Progesteron-Sekretion je einer graviden ("W") mit einer inseminierten aber nichtgraviden Kalbin ("Z") Tag 24

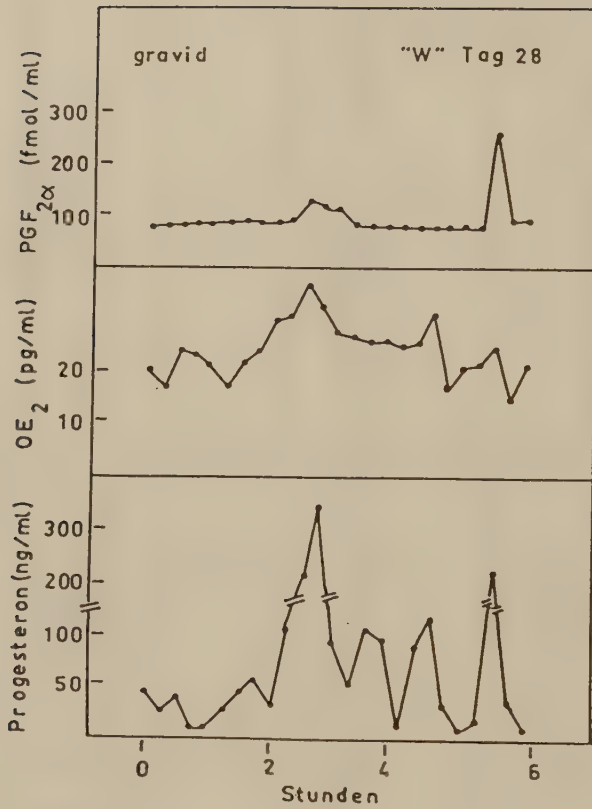


Abb. 31 PGF_{2α}, Östradiol-17β- und Progesteron-Sekretion einer graviden Kalbin ("W") Tag 28

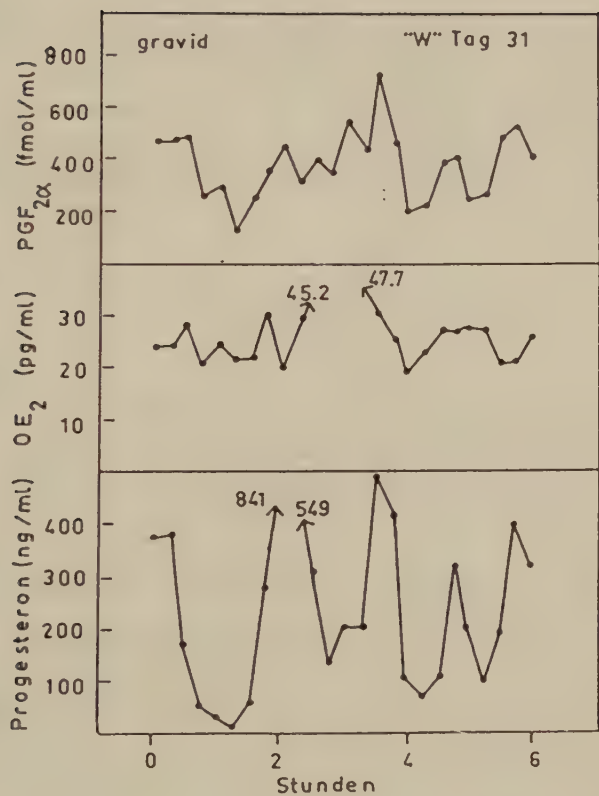


Abb. 32 $\text{PGF}_{2\alpha}$ -, Östradiol-17 β - und Progesteron-Sekretion einer graviden Kalbin ("W") Tag 31

3.2.3. Prostaglandin-Sekretion während der Tage 28 - 34 der Frühgravidität

Bei 5 später als eindeutig trächtig befundenen Kalbinnen, bei denen der gesamte Frühgraviditätsverlauf von Tag 14 - 34 durch zweistündige Blutentnahme dokumentiert werden konnte, wurden die Prostaglandin - Konzentrationen der 5. Graviditätswoche in der Vena cava caudalis bestimmt und jeweils der Mittelwert von 12 Proben/Tag gebildet (Einzelwerte im Tabellenanhang).

3.2.3.1. Primäres Prostaglandin F_{2a}

Individuelle Konzentrationen einzelner Tiere in der Vena cava weisen eine relativ gute Übereinstimmung auf.

Die Abbildung 33 zeigt die Tagesmittelwerte und Standardabweichungen (12 Proben/ Tier/Tag) von PGF_{2a} an den Graviditätstagen 28 - 34.

Bis zum Tag 30 schwanken die Konzentrationen um einen Basalwert von 100 - 200 fmol/ml.

Ab Tag 31 steigen die Durchschnittswerte deutlich an und erreichen am Tag 32 im Mittel 450 fmol/ml mit einer Standardabweichung von 150 fmol/ml, wobei einzelne Tiere Konzentrationen bis 1100 fmol/ml erreichten.

Ein rascher Abfall auf ein Basalniveau von 200 fmol/ml ist ab Tag 32 feststellbar.

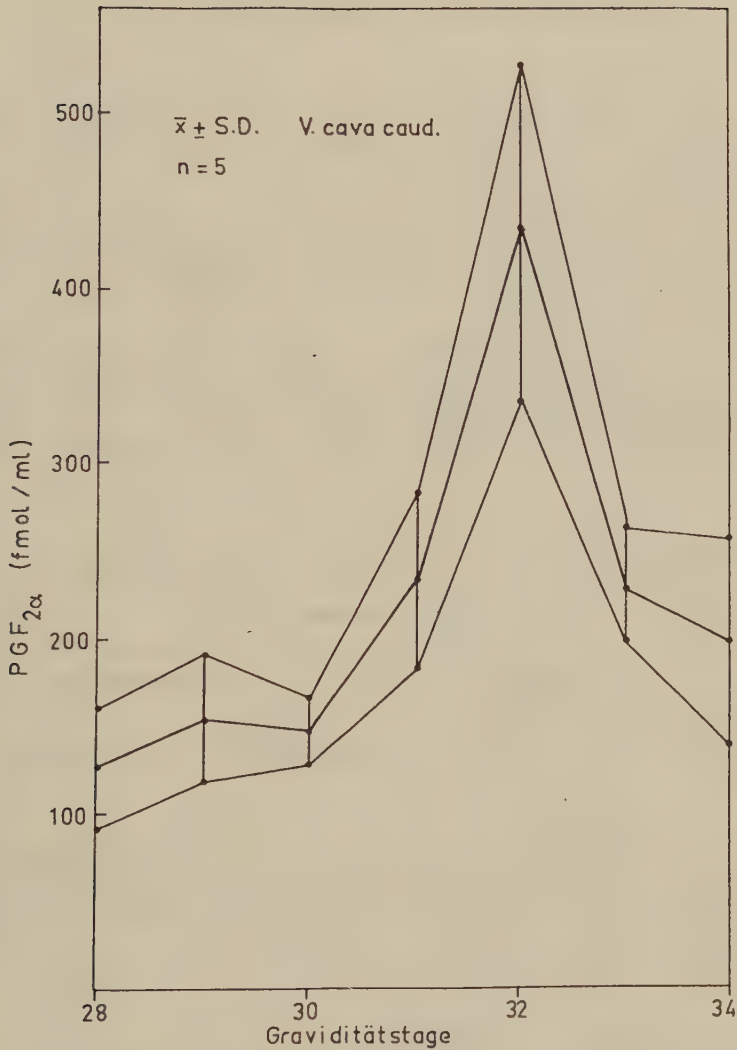


Abb. 33 Prostaglandin $F_{2\alpha}$ in der V. cava caud. während der Graviditätstage 28 - 34
Mittelwerte $\pm$ S.D. (12 Proben/Tier/Tag) von 5 graviden Kalbinnen

3.2.3.2. Vergleich von primären und metabolisierten Prostaglandinen in Vene und Arterie.

Bei einem graviden Tier (Wera) wurden sowohl PGF_{2a} , als auch 6-keto- PGF_{1a} , ein Prostacyclin-Metabolit, gemessen und gegenübergestellt.

Da primäres Prostaglandin F_{2a} während einer einzigen Lungenpassage zu 90 % metabolisiert wird und im peripheren Blut kaum mehr nachweisbar ist, wurde die Konzentration nur in der V. cava caud. bestimmt.

Die Messung von 6-keto- PGF_{1a} erfolgte sowohl in der V. cava caud. als auch in der Aorta abdominalis, da der Metabolismus von Prostacyclin nicht in der Lunge erfolgt.

Die Abbildung 34 zeigt eine Gegenüberstellung beider Prostaglandine.

Die PGF_{2a} -Konzentrationen bewegen sich bis zum Tag 31 auf einem Basalniveau von ca. 150 fmol/ml, wobei allerdings bereits einige deutliche Ausschüttungen auffallen.

An den Tagen 31 - 32 werden stets höhere Konzentrationen (bis zu 700 fmol/ml) gemessen, ein Abfall der durchschnittlichen Konzentrationen ist ab Tag 33 feststellbar.

6-keto- PGF_{1a} Freisetzen sind von Tag 28 - 31 nicht nachweisbar.

Ab Tag 32 werden Ausschüttungen von 800 fmol/ml sowohl in der V. cava caud. als auch in der Aorta abd. gemessen. Diese auf hohem Niveau verbleibenden Konzentrationen dauern 2 Tage an und fallen anschließend unter die nachweisbare Grenze von 80 fmol/ml.

Wenn die Differenz aus Absolutwert in der V. cava caud. und Aorta abdominalis gebildet wird, um eine mögliche Sekretion aus dem Uterus zu erfassen, zeigt sich jedoch, daß die Konzentrationen in der Aorta bei ca. 20 % der Bestimmungen über denen in der V. cava caud. liegen.

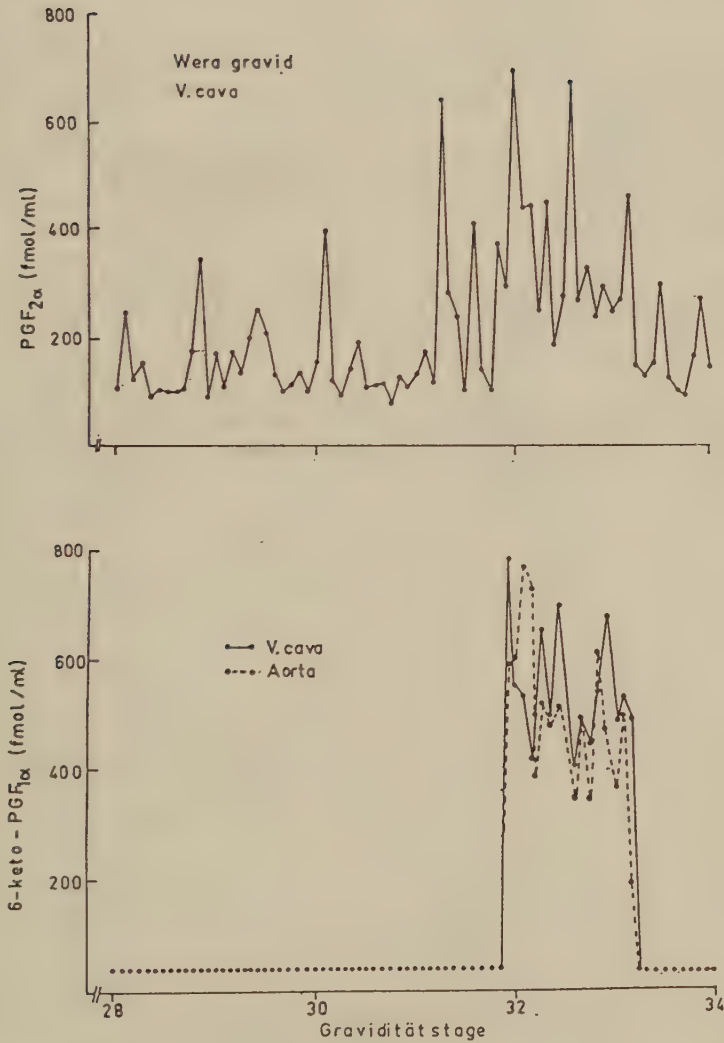


Abb. 34 $\text{PGF}_{2\alpha}$ (V. cava caud.) und 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ (V.cava caud. und A. abd.) während der Graviditäts-Tage 28 - 34 (Kalbin "W")
 Proben wurden alle 2 Stunden gezogen
 < Meßbereich

Bei einer weiteren Kalbin (Gül) wurde zusätzlich zu PGF_{2a} und 6-keto- PGF_{1a} der Metabolit von PGF_{2a} , PGFM, mitbestimmt. Die Messung von PGF_{2a} und PGFM erfolgte in der V. cava caud., von 6-keto- PGF_{1a} zusätzlich auch in der Aorta abd. (Abb. 35).

PGF_{2a} schwankt ähnlich wie bereits bei der Kalbin "Wera" (Abb. 34) dargestellt, bis zum Tag 32 ebenfalls in einem Bereich von 80 - 250 fmol/ml.

Ab Tag 32 ist eine verstärkte Sekretion bis 1100 fmol/ml festzustellen die eineinhalb Tage anhält und dabei nie auf Basalniveau abfällt.

6-keto- PGF_{1a} erreicht in beiden Gefäßen Konzentrationen von >1000 fmol/ml an den Tagen 32 und 33, danach folgt ein rascher Abfall bis unter den Meßbereich.

Im Gegensatz zum primären PGF_{2a} fallen die Konzentrationen von PGFM in der Vena cava caudalis immer wieder auf Basalniveau ab.

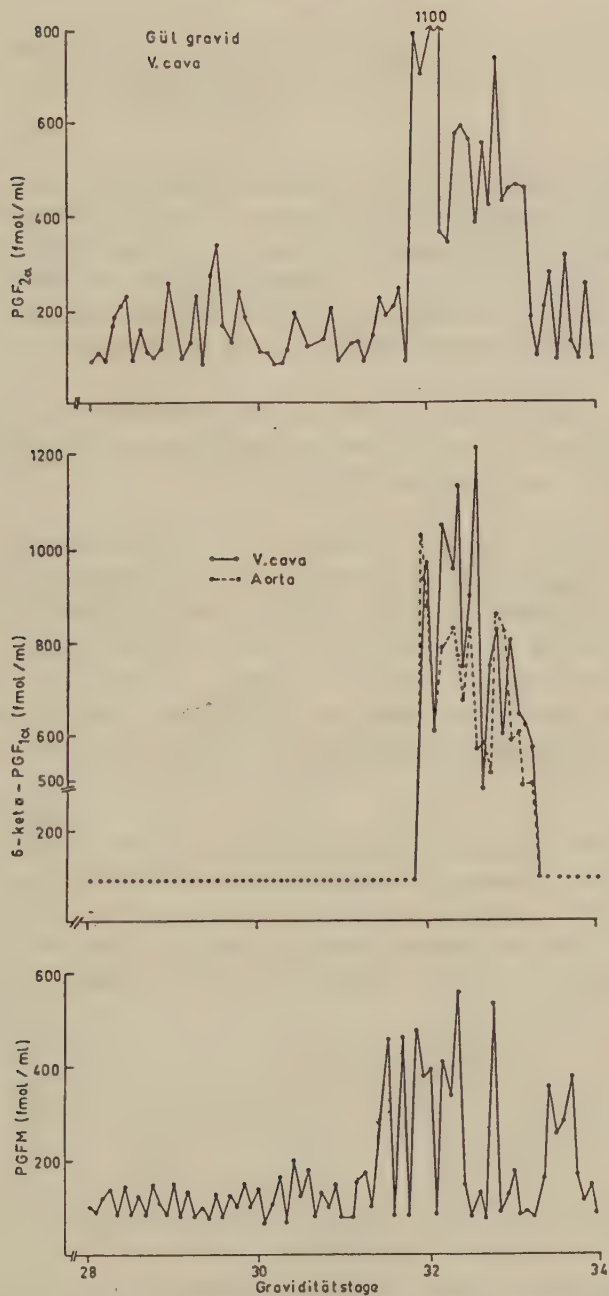


Abb. 35 $PGF_{2\alpha}$, 6-keto- $PGF_{1\alpha}$ und PGFM während der Graviditätstage 28 - 34 der Kalbin "Gül"
 Proben wurden alle 2 Stunden gezogen
 < Meßbereich

3.2.4. Östradiol-17 β -, 6-keto-PGF_{1a} und PGF_{2a} während der ersten fünf Wochen der Gravidität

Bei fünf Kalbinnen, die nach Brunstinduktion inseminiert und nach 6 Wochen durch rektale Untersuchung als gravid befunden wurden, konnten während der ersten 5 Graviditätswochen alle 2 Stunden Blutproben aus der Vena cava gezogen und ausgewertet werden. (Dies erfolgte zusätzlich zu den Entnahmen alle 15 Minuten über 6 Stunden alle 2 - 3 Tage). (Abb.36).

Östradiol-17 β steigt während der ersten Graviditätstage an (10 pg/ml), erreicht am sechsten Tag die höchsten Werte von 12 ± 8 pg/ml und fällt am siebenten Tag stark ab (4 ± 2 pg/ml).

Von Tag 7 bis Tag 25 ist ein mäßiger (6 - 12 pg/ml), von Tag 28 - 34 ein ausgeprägter Anstieg auf durchschnittlich 20 ± 10 pg/ml zu verzeichnen. Die Konzentrationen an 6-keto-PGF_{1a} bewegen sich bis zum Tag 28 im Basalbereich von ca. 200 fmol/ml, an den Tagen 32 und 33 ist jedoch ein rascher Anstieg auf mittlere Konzentrationen von 750 fmol/ml festzustellen. Darauf folgt ein deutlicher Konzentrationsabfall auf Basalniveau.

PGF_{2a} verbleibt während der ersten 28 Graviditätstage bis auf 2 kurze Perioden erhöhter Freisetzungen am Tag 3 (200 fmol/ml) und Tag 14 (250 fmol/ml) auf Basalniveau, steigt ab Tag 30 auf durchschnittliche Konzentrationen von 450 ± 250 fmol/ml an und fällt ab Tag 33 wieder auf Basalniveau (200 fmol/ml) ab.

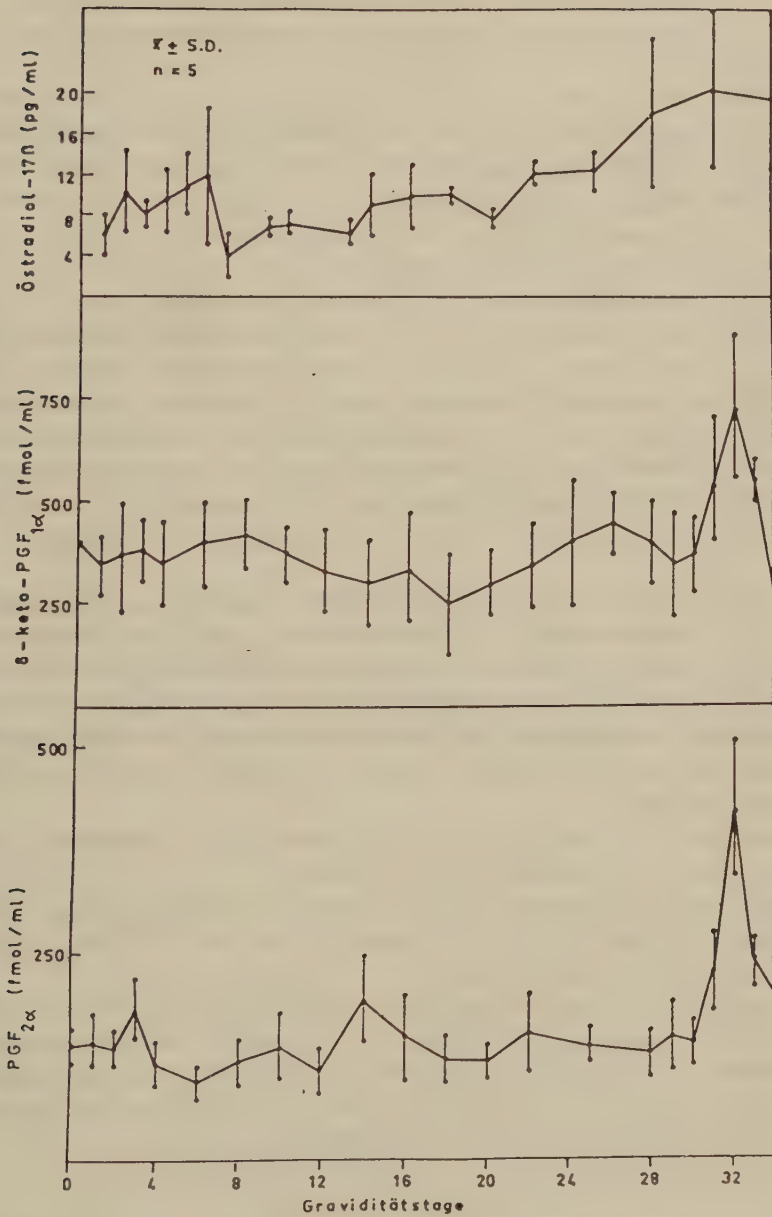


Abb. 36 Vergleich der Konzentrationen von Östradiol-17β, 6-keto-PGF_{1α} und PGF_{2α} in der V. cava caudalis von 5 graviden Kalbinnen während der ersten 5 Graviditätswochen. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ S.D.

3.2.5. Ovarsteroid- und Prostaglandin-Sekretion während der Luteolyse im Vergleich zur Frühgravidität

Eine Gegenüberstellung von einem Tier mit Luteolyse ("Lea" nichtgravid), und einem Tier mit fortdauernder Gravidität ("Gül") zeigen die Abbildungen 37 und 38.

Die Blutentnahme erfolgte zweistündig aus der V. cava caudalis.

Verglichen werden jeweils die Konzentrationen der Hormone PGF_{2a} , 6-keto- PGF_{1a} , Östradiol-17 β und Progesteron an den Tagen 21 - 28 post inseminationem (die Kalbin "Lea" zeigte einen verlängerten Zyklus von 27 Tagen) mit den Graviditätstagen 28 - 34, um die Größenordnungen der während der Luteolyse im Vergleich zu den Frühgraviditätstagen 32 - 33 auftretenden Prostaglandin - Ausschüttungen gegenüberzustellen.

Erste PGF_{2a} -Freisetzungen (500 fmol/ml) fanden bereits 5 Tage, massive Freisetzungen 4 bis 2 Tage (4000 fmol/ml) vor der an den Tagen 27 und 28 eintretenden Brunst statt (Abb.37). Auffallend dabei das Auftreten von sechs massiven Freisetzungen hintereinander, die jeweils von 4 - 12 Stunden dauernden Perioden basaler Sekretion abgelöst wurden und ganz verschwinden.

Dabei wurde 6-keto- PGF_{1a} nicht vermehrt ausgeschüttet und blieb auf Basalniveau um 100 fmol/ml.

Östradiol-17 β hingegen steigt nach der ersten PGF_{2a} -Freisetzung allmählich an und erreicht am Tag vor der Brunst Konzentrationen um 100 pg/ml.

Progesteron, das eine Konzentration von 80 ng/ml an den Tagen -7 bis -5 aufweist, sinkt im Gefolge von PG - Ausschüttungen jeweils ab, trotzdem treten vereinzelte hohe Ausschüttungen bis 3 Tage vor der Brunst auf, danach ist endgültig Basalniveau um 1 ng/ml in der V. cava erreicht.

Beim graviden Tier, das bis zum Tag 31 PGF_{2a} -Konzentrationen um 200 fmol/ml aufwies, ist ein plötzlicher Anstieg der Konzentrationen ab Tag 32 auf etwa 1000 fmol/ml auffallend. Dieses hohe Niveau wird bis zum Tag 33 beibehalten, danach erfolgt ein Abfall auf Basalniveau (150 fmol/ml).

Somit liegen andere Sekretionsmuster beim graviden und nicht-graviden Tier vor.

6-keto- PGF_{1a} , bis zum Tag 32 nicht meßbar, zeigte ab diesem Graviditätszeitpunkt das gleiche Verhalten und erreichte am Tag 32 Konzentrationen von 1100 fmol/ml. Während der Luteolyse erfolgt keine Ausschüttung.

Östradiol-17 β hingegen schwankte beim trächtigen Tier immer in einem Bereich zwischen 5 und 20 pg/ml.

Progesteron blieb, mit stark ausgeprägten kurzzeitigen Freisetzungen konstant auf einem hohen Niveau mit Maximalwerten bis 80 ng/ml.

Auffallend an der Gegenüberstellung ist, daß beim graviden Tier "G" trotz PGF_{2a} -Ausschüttung eine unveränderte Freisetzungsscharakteristik von Progesteron vorhanden ist.

Im Gegensatz dazu fällt bei der nichtgraviden "I" nach Auftreten der ersten PGF_{2a} -Freisetzungen der Progesteron - Spiegel stark ab.

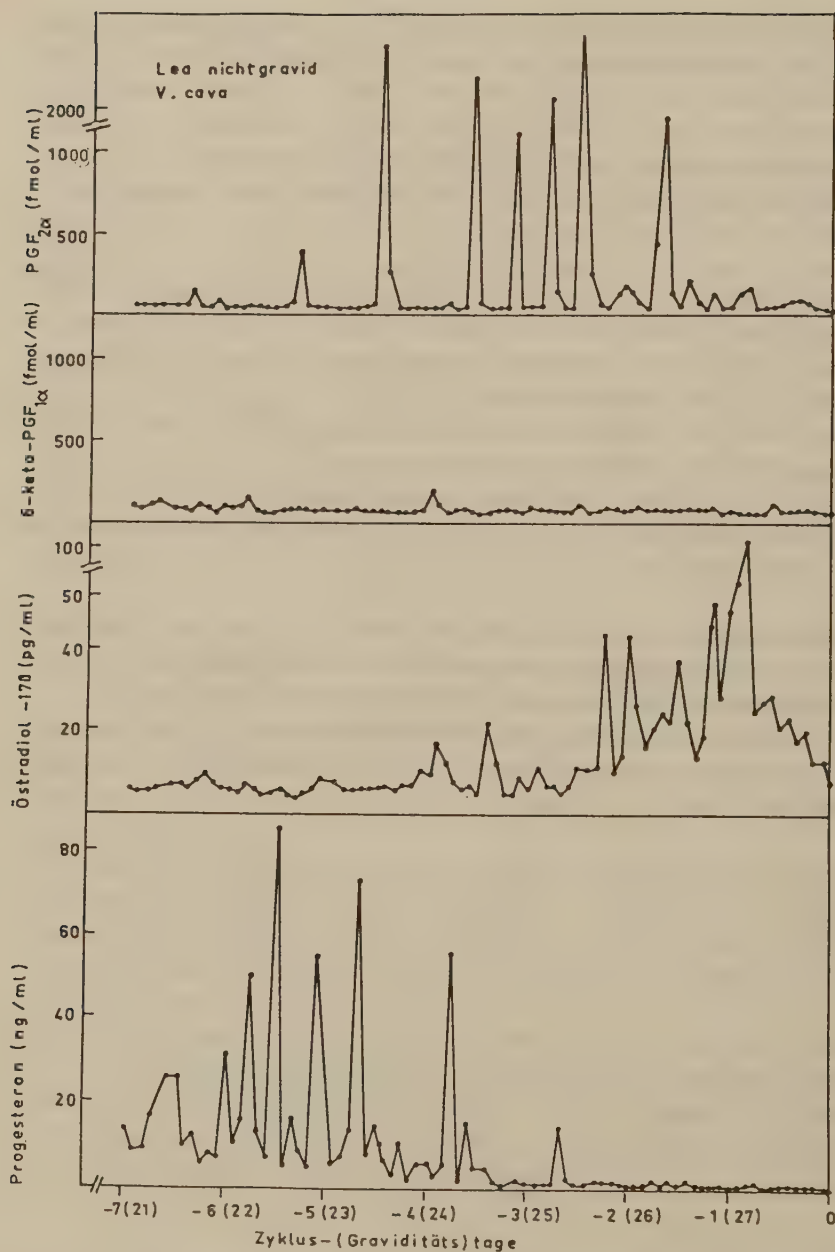


Abb. 37 Konzentrationen von PGF_{2α}, 6-keto-PGF_{1α}, Östradiol-17β und Progesteron in der V. cava caud. an den Tagen 21 - 28 p. insemin. bei der am Tag 28 umrindernden Kalbin "L", (Probennahme im Abstand von 2 Stunden)

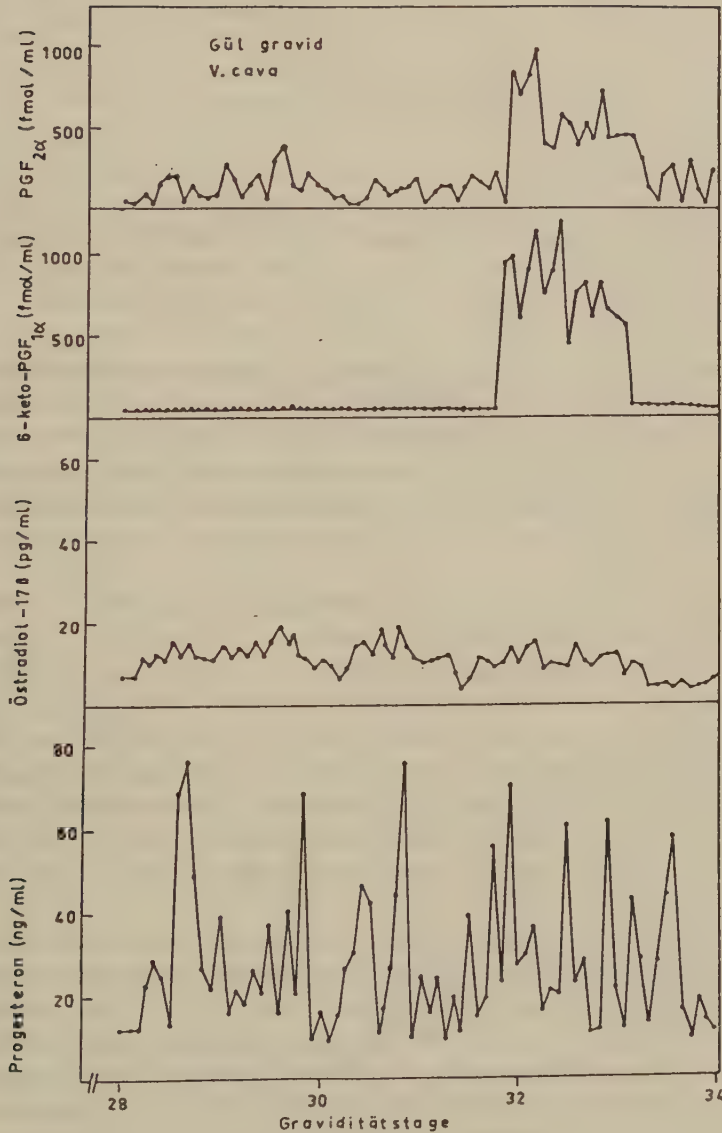


Abb. 38 Konzentrationen von PGF_{2α}, 6-keto-PGF_{1α}, Östradiol-17β und Progesteron in der V. cava caud. an den Tagen 28 - 34 p. insem. bei der graviden Kalbin "G" (Probennahme im Abstand von 2 Stunden)
..... < Meßbereich

4. Diskussion

4.1. Zur Erfassung der Kurzzeitsekretion von Ovarhormonen

Eine diskontinuierliche (pulsatile) Sekretion von Hormonen konnte erstmals von Dierschke et al. (1970) am Beispiel von LH beim ovariectomierten Rhesusaffen gezeigt werden und wurde in der Zwischenzeit bei einer Vielzahl von Spezies bestätigt.

Progesteron und Östradiol-17 β werden während der untersuchten Reproduktionsstadien ebenfalls diskontinuierlich ausgeschüttet (Walters, Schams, Schallenger 1984). Allerdings sind die geringen Konzentrationen an Ovarhormonen die im peripheren Blut des weiblichen Rindes zirkulieren nicht mehr in der Lage, diese Sekretionsart verlässlich wiederzuspiegeln (Schallenger et al. 1985b).

Es ist daher notwendig, die Hormonabgabe direkt bzw. in der Nähe der Produktionsstätte, zu erfassen, um den Verteilungseffekt in der Blutbahn möglichst gering zu halten.

Mit der von Walters und Schallenger (1982) entwickelten Operationstechnik der Katheterisierung von Aorta abdominalis und Vena cava caudalis und der synchronen Blutentnahme sind gute Vergleichsmöglichkeiten von Steroidzufuhr und -abgabe zu und vom Reproduktionstrakt geschaffen worden.

Die Dauerkatheter blieben bei den von uns durchgeführten Versuchen bei 16 von 23 Tieren über Wochen reaktionslos in den Gefäßen liegen, bei 7 Tieren waren nach 2 - 22 Tagen keine Blutproben mehr aus einem oder beiden Gefäßen zu entnehmen. Kein Tier zeigte jedoch dabei manifeste Symptome von Thrombophlebitis. Selbst nach einer Verweildauer von sieben Monaten kann noch ein problemloser Aortenblutfluß vorhanden sein. Voraussetzung ist allerdings eine möglichst sterile Operationstechnik und eine optimale Katheterpflege, um mögliche Infektionen weitgehend auszuschließen.

Ein Problem stellt die Position der Katheterspitze an der Einmündung der Ovargefäße in die Vena cava dar, so daß die jeweiligen Progesteron-oder Östradiol-17 β Konzentrationsangaben daher stets als relative Größen gewertet werden müssen.

Die Quotientenbestimmung von Vena cava caudalis und Aorta abdominalis Konzentration bietet zwar einen guten Anhaltspunkt für die Positionierung der Katheterspitzen, konsekutiv gezogene Proben können jedoch durchaus unterschiedliche Quotienten aufweisen (Abb.4).

Bei den durchgeführten Versuchen hatte die Kalbin "B" wohl eine annähernd optimale Position, so daß Progesteronkonzentrationen am Zyklustag 10 bis 2300 ng /ml gemessen werden konnten (Abb.13). Durch den Verteilungseffekt konnten wir in der Peripherie allerdings auch nur Werte von 10 ng/ml feststellen. Diese Konzentrationen unterscheiden sich nicht sehr wesentlich von jenen, welche direkt in der Uterusovar-Vene zu messen sind (Hixon et al. 1983).

Somit kann zwar die Kurzzeitsekretion der Ovarsteroiden und bei zufällig exakter Position der Katheterspitze an der Einmündung der Uterusgefäße, auch die Kurzzeitsekretion der Uterushormone erfaßt werden, eine Vergleichsmöglichkeit der V. cava caud. Konzentrationen zwischen unterschiedlichen Tieren ist jedoch nur eingeschränkt möglich.

Eine statistische Auswertung der Angaben verschiedener Tiere ist deshalb wenig sinnvoll.

Um repräsentative Konzentrationsunterschiede aufzuzeigen wären andere Operationstechniken notwendig. Vorstellbar ist eine Laparatomie und eine direkte Blutableitung aus den Uterus- und Ovargefäßen.

4.2. Kurzzeitsekretion der Steroidhormone und Prostaglandine während des Brunstzyklus und der Tage 1 - 31 der Frühgravidität

Eine pulsatile Östradiol-17 β Sekretion mit ca. 4 Pulsen in 6 Stunden konnte bei unseren durchgeführten Versuchen gleichbleibend am Tag vor der Brunst und sowohl am Zyklus- als auch am Graviditätstag 5 nachgewiesen werden. Die relativen Konzentrationen lagen an diesen Tagen stets deutlich höher als an den darauffolgenden Tagen (Abb.15,16,18,19).

Auffallend ist die relativ hohe Frequenz am Tag vor der Brunst und eine ähnliche Sekretionsrate am Tag 5 des Zyklus bzw. der Gravidität. Kesner et al. (1981) vermuteten, daß die hohen präovulatorischen Östradiol-17 β Konzentrationen einen "positiven Feedback" an der Hypophyse und dadurch eine erhöhte Sensitivität gegenüber einer GnRH - Stimulierung induzieren und somit zur Brunstauslösung führen. Voraussetzung ist das Vorhandensein eines präovulatorischen Follikels, der unter Östrogeneinfluß heranwächst und daher gegenüber frequenten LH - Stimuli eine erhöhte Empfindlichkeit aufweist.

Es konnten annähernd so hohe Östradiol-17 β - Konzentrationen an den Zyklus- bzw. Graviditätstagen 5 - 7 festgestellt werden. Dies kann als Ausdruck hoher Follikelaktivität während dieses kurzen Zeitraumes der Lutealphase gewertet werden. Nach der Luteolyse, wenn nur mehr geringe Progesteronkonzentrationen nachweisbar sind (Abb.15 u.16), steigt die Östradiol-17 β - Sekretion sehr deutlich an (Abb.37).

Nach Short et al. (1979) kann Östradiol-17 β während der Lutealphase keine präovulatorischen LH - Ausschüttungen stimulieren, da niedrige Östradiol-17 β und hohe Progesteron - Konzentrationen einen andauernden "negativen Feedback" induzieren. Als Folge dieses "negativen Feedbacks" können zwar Inter-Östrusfollikel heranreifen, ohne Luteolyse aber keine Umschaltung auf "positiven Feedback" von Östradiol-17 β auf die Gonadotropine erfolgen und somit keine Brunst und Ovulation ausgelöst werden.

Nach der Ovulation des Brunstfollikels entfällt dessen hemmender Einfluß und neue Interöstrusfollikel können heranreifen. Schneeбели und Döbeli (1984) geben dafür einen Zeitraum von 4 - 6 Tagen an, das heißt, daß nach 4 - 6 Tagen erhöhte Östradiol-17 β - Konzentrationen aus diesen Gebilden nachweisbar sein müßten, die eine beginnende Brunst vortäuschen und zu Fehlinterpretationen Anlaß geben könnten.

Die bei unseren Versuchen gefundenen Östradiol-17 β Konzentrationen an den Tagen 4 - 6 könnten diese These bestätigen (Abb. 16 - 21).

Schallenger (1985) erfaßte ähnliche Freisetzungen am Zyklustag 3 - 4 und Glencross et al. (1973) ermittelten vergleichbare Konzentrationen an den Tagen 6 - 7.

Schneeбели (1977) und Schneeбели und Eggenberger (1985) palpieren ab dem Zyklus- bzw. Graviditätstag 5 - 7 Interöstrusfollikel und konnten durch manuelles Entfernen bei frisch inseminierten Rindern die Non - Return - Rate gegenüber Kontrolltieren ohne Behandlung signifikant erhöhen.

Eine Beteiligung des Konzeptus an der Östradiol-17 β - Sekretion am Graviditätstag 5 konnte mit den durchgeführten Versuchen nicht nachgewiesen werden.

Da Schallenger et al. (1986a,b) bei Versuchen mit selektiver Erfassung nur des Uterusabflusses ebenfalls erhöhte Östradiol-17 β - Ausschüttungen bereits nach der ersten Graviditätswoche feststellten, vermuteten sie bereits so früh ein erstes Signal des Konzeptus für die Erhaltung der Gravidität.

Es ist nicht ausgeschlossen, daß der Konzeptus bereits zu diesem Zeitpunkt zur Östradiol-17 β - Synthese befähigt ist. Aufgrund der massiven Östradiol-17 β - Sekretion zur frühen Lutealphase aus dem Ovar erscheint es aber eher unwahrscheinlich, daß eine Signalübertragung vom Embryo zur Mutter mittels Östradiol-17 β schon zu diesem frühen Stadium möglich ist.

Beim Vergleich der Kurzzeitsekretion der Ovarsteroidoide konnten keine Unterschiede zwischen Zyklus und Gravidität zu diesem Zeitpunkt festgestellt werden (Abb.22).

Eine Erkennung der Gravidität mittels der Ovarsteroidoide am Graviditätstag 5 kann wohl ausgeschlossen werden.

Eine Voraussetzung für die maternale Erkennung und Erhaltung der Gravidität beim Rind ist nach Ansicht von Northey und French (1980) die Anwesenheit eines Embryos im Uterus.

Sie postulieren dafür einen nicht näher bezeichneten luteotropen Faktor.

Ford et al. (1979) sehen in der Zunahme des Blutflusses, der vom Östradiol-17 β / Progesteron Verhältnis abhängig sein soll, eine Möglichkeit der Signalübertragung. Diese Untersuchungen beziehen sich auf Blutflußmessungen ab Tag 13 post inseminationem.

Fabian (1981) stellte einen Zusammenhang zwischen Blutfluß und Lymphdrainage des graviden Uterushornes her und Magness und Ford (1982) bestätigten dies indem sie zeigten, daß die Steroidkonzentrationen der Uteruslymphe die Konzentrationen im Uteruslumen und im uterinen venösen Blut reflektieren.

In vitro Versuche mit bovinen Embryonen verdeutlichen die Fähigkeit des isolierten Konzeptus zur Östradiol-17 β Synthese. Lukaszewska und Hansel (1980) sehen erste Auswirkungen des Konzeptus ab Tag 8 der Gravidität auf den Progesteronspiegel. Holness et al. (1977) und Henricks et al. (1970) schreiben dem Konzeptus eine direkte oder indirekte Wirkung auf den Progesteronspiegel bzw. auf den Erhalt des Corpus luteum zu.

Dies läßt den Schluß zu, daß Östrogene, die vom Konzeptus produziert werden, einen steigenden Blutfluß induzieren könnten, der für den Transport von Substanzen, wie z. B. Prostaglandinen, vom Lumen des graviden Uterus zum Ovar entscheidend sein könnte.

Östrogene embryonalen Ursprungs könnten somit indirekt durch vermehrten Blutfluß zum Ovar den Transport von Progesteron erhöhen und damit eine "luteotrope" Wirkung haben. Ein direkter Effekt von Östrogenen erscheint unwahrscheinlich, da Östradiol-17 β die LH - induzierte Progesteronsekretion bei bovinen Zellkulturen hemmt (Williams und Marsh 1978).

Wenn Östrogene in der Lage sind, den Blutfluß vom Uterus zum Ovar zu erhöhen und durch vermehrte Progesteronsekretion der Erhalt einer Gravidität möglich erscheint, müßte zu den Graviditätstagen 5 - 13 sowohl die Östradiol-17 β -, als auch die Progesteronsekretion gegenüber den anderen Tagen der Gravidität im Vergleich zum Zyklus erhöht sein.

Hansel und Lukaszewska (1978) konnten bei ihren Versuchen dies sogar im peripheren Blut bestätigen, wohingegen Schallenger (1985) zwar höhere Progesteronkonzentrationen während der Frühgravidität erfaßte, aufgrund der hohen Streuungen aber keinen signifikanten Unterschied zum Brunstzyklus postulieren konnte.

Auch eine mögliche Steroidhormonsekretion des Konzeptus müßte sich in der Zirkulation der Vena cava caudalis abzeichnen.

Bei unseren Versuchen konnte dies allerdings nicht bestätigt werden. Sowohl die Kurzzeitsekretion von Progesteron, die gleichzeitig oder innerhalb weniger Minuten nach LH/FSH oder nur nach FSH - Stimulierung induziert wird (Walters et al. 1984), als auch die Östradiol-17 β - Sekretion, die mit einer zeitlichen Verzögerung bis ca. 25 Minuten einer pulsatilen LH - Ausschüttung folgt, blieb über den gesamten Versuchszeitraum in der gleichen Frequenz erhalten (Abb.20 - 24).

Bis zur Luteolyse ist kein nennenswerter Unterschied der Kurzzeitsekretion der Steroidhormone Progesteron und Östradiol-17 β zwischen zyklischen und graviden Tieren festzustellen (Abb.20 u. 21). Eine maternale Erkennung der Frühgravidität über den Regelkreis Steroidhormone - Hypothalamus bzw. Hypophyse kann mit diesem Ansatz nicht bestätigt werden. Dies schließt jedoch nicht aus, daß andere Parameter eine wesentliche Rolle spielen können.

Das Hypothalamus/Hypophysen System reagiert erst nach einer Luteolyseinduktion durch PGF_{2a} mit fallender Progesteronkonzentration und mit 1 - 2 Tagen verzögert ansteigender Östradiol-17 β Konzentration (Abb.37).

Eine Verhinderung der Luteolyse und somit ein Erhalt der Gravidität scheint somit doch primär in der Ausschaltung des luteolytischen Prinzips begründet zu sein.

Nach Shemesh et al. (1979) kann die präimplantierte Blastocyste ab Tag 13 in vitro Prostaglandine produzieren.

In vivo konnten Feck (1985) beim Rind und Silvia et al. (1984) beim Schaf zu diesem Zeitpunkt ebenfalls erhöhte PGF_{2a} -Konzentrationen feststellen. Diese Sekretionen scheinen aber keine Auswirkungen auf den Steroidstatus zu haben.

Entscheidend für die Luteolyseinduktion ist wohl allein die Frequenz der PGF_{2a} -Freisetzungen, da beim Schaf eine mindestens fünfmalige Gabe von PGF_{2a} innerhalb von 25 Stunden eine Luteolyse einleiten konnte, während bei einmaliger Applikation eine 40fache Menge notwendig war (Schramm et al. 1983).

Thatcher et al. (1985) zeigten bei in vitro Versuchen, daß das Endometrium von graviden Rindern in der Lage ist PGF_{2a} zu synthetisieren, so daß vielleicht in vivo ähnliche Verhältnisse vorliegen könnten.

Die PGF_{2a} Kurzzeitsekretion am Tag 14 ist in der V. cava caud. sowohl bei einem graviden, als auch bei einem nichtgraviden Tier nachweisbar. Die Frequenz der Freisetzungen ist vergleichbar, die Amplitude beim nichtgraviden Tier dagegen etwa zweimal so hoch. Es besteht wohl die Möglichkeit, daß die 14 Tage alte Blastocyste bzw. das Endometrium zu diesem Zeitpunkt, in der Lage ist, Prostaglandin F_{2a} zu synthetisieren und abzugeben.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in der gleichzeitigen Synthese von PGE_2 zu sehen sein.

Henderson et al. (1977) zeigten beim Rind eine Dominanz von PGE_2 über eine PGF_{2a} induzierte Luteolyse, indem sie beide Prostaglandine simultan in die Ovararterie infundierten und dadurch eine Luteolyse verhindern konnten.

Außerdem war PGE_2 in der Lage einen PGF_{2a} induzierten Rückgang von lutealen LH - Rezeptoren beim nichtgraviden Schwein zu verhindern (Reynolds et al. 1981).

Weitere Untersuchungen von Reynolds et al. (1983) sehen einen engen Zusammenhang von PGE_2 und Östradiol-17 β für den Erhalt einer Gravidität. Sie vermuten, daß Östradiol-17 β ein Ansteigen des Lymph- und des venösen Blutflusses verursacht, dadurch den Transport von PGE_2 vom Uteruslumen zum Ovar ermöglicht und somit direkt die Progesteronsekretion der Lutealzellen stimuliert.

Eine Kurzzeitsekretion von PGF_{2a} an den Tagen 16, 18, 20 und 24 ist beim graviden Tier in der Vena cava caudalis nicht nachweisbar (Abb. 27 - 30). An den vergleichbaren Tagen post inseminationem von verspätet umrindernden Kalbinnen schwankt die Amplitude von PGF_{2a} jeweils in einem Bereich von 100 - 350 fmol/ml (Abb. 27 - 30).

Nach unseren Untersuchungen sind zum Tag 16 nur Unterschiede in der Kurzzeitsekretion von PGF_{2a} und Progesteron vorhanden. Wie nun die Regression der PGF_{2a} -Sekretion zu diesem Zeitpunkt zustande kommt, konnte mit den hier berichteten Analysemethoden nicht geklärt werden.

Auch die Frage des Zusammenwirkens von Östradiol-17 β , Progesteron und Prostaglandinen für die Graviditätserhaltung und deren selektive Sekretionserhöhung bzw. -senkung durch einen oder viele noch näher zu bestimmende Stimuli ist noch offen.

Der Kontakt des Embryos mit dem Endometrium am Tag 16 - 18 ist bereits sehr eng, so daß wahrscheinlich bereits geringe Konzentrationen an Gewebshormonen bzw. Frühgraviditätsfaktoren für einen lokalen Stoff- und Informationsaustausch ausreichend sind und auf diesem Weg eine Auslösung des Luteolysemechanismus verhindert werden könnte.

Desweiteren sind in diesem Zusammenhang immunsuppressive Einflüsse der Zygote bzw. Blastozyste auf die maternale Immunabwehr zu diskutieren (siehe Kapitel 1.1.).

Ebenfalls ungeklärt blieb die Frage der Verlängerung des Zyklus bei inseminierten, aber nicht gravid verbliebenen Kalbinnen (Abb.27 - 32, 37).

Die Möglichkeit einer erfolgten Konzeption mit nachfolgender Resorption in den ersten Tagen post inseminationem kann nicht ausgeschlossen werden.

Bei einer vergleichbaren, nicht inseminierten Kalbin mit regelmäßigem Zyklus von 21 Tagen konnten zu diesem Zeitpunkt wegen nicht durchgängiger Katheter keine Blutproben gewonnen werden, so daß die direkte Vergleichsmöglichkeit von Kurzzeitsekretionsrhythmen der angesprochenen Hormone fehlt.

Zwei Tage vor der Luteolyse traten bei der Kalbin "Lea" (Abb. 37) die für die Luteolyse charakteristischen, mehrere Stunden andauernden PGF_{2a} -Freisetzungen auf (Kindahl et al. 1981, Thatcher et al. 1985, Schallenberger et al. 1986b, Meyer et al. 1986).

Erste PGF_{2a} -Freisetzungen (500 fmol/ml) sind bereits 5 Tage und massive Freisetzungen (4000 fmol/ml) 2 Tage vor der Brunst festzustellen.

Auffallend ist das annähernd rhythmische Auftreten mehrmaliger PGF_{2a} - Freisetzungen hintereinander, der darauffolgende Rückgang der Progesteron- und ein Anstieg der Östradiol-17 β - Konzentration.

Die graphische Darstellung der Kurzzeitsekretionsprofile (Abb. 30) verdeutlicht diese Sequenzen. Bei den intensiven Blutprobenentnahmen (alle 15 Minuten über sechs Stunden), wie in Abb. 30 wiedergegeben, können allerdings aufgrund der Trefferquote nur gelegentlich wenige massive Ausschüttungen erfasst werden. Die Abfolge mehrmaliger massiver PGF_{2a} -Freisetzungen vor, während und nach der Luteolyse kann gut entweder durch Blutentnahmen in stündlichem (Kindahl et al. 1981) oder in 2-stündigem Abstand dokumentiert werden, wie wir sie durchgeführt haben. Dadurch ist gewährleistet, daß mehrere Ausschüttungen über einen längeren Zeitraum erfaßt werden ohne das Spendertier unnötig zu belasten.

Eine Verhinderung der Luteolyse durch Blockade der PGF_{2a} -Sekretion im Endometrium wird wohl durch den Konzeptus gesteuert, der Substanzen produziert, die über einen primär lokalen Weg (Lymphe, Gewebsdifffusion) oder vielleicht durch den von McCracken et al. (1981) beschriebenen "counter - current" - Mechanismus einen Rückgang der Progesteronsynthese im Corpus luteum verhindern könnten (Del Campo et al. 1977, Northey und French 1980).

Mit dem von uns durchgeführten Versuch konnte zwar das "luteolytische Prinzip" von PGF_{2a} und somit das Ausbleiben maximaler Freisetzungen während der Gravidität bestätigt werden, ein Zusammenhang zwischen Graviditätserhalt und Prostaglandinsekretion konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Prostacyclin, das wegen der extrem hohen Instabilität im wässrigen Milieu nur in metabolisierter Form als 6-keto- PGF_{1a} in biologischen Proben gemessen werden kann, war bei unseren Versuchen zu diesem Zeitpunkt nicht nachweisbar (Abb.38). Milvae und Hansel (1980 und 1983) haben Rezeptoren für PGI_2 im Corpus luteum nachgewiesen und gehen davon aus, daß durch PGI_2 die Progesteronsynthese im Gelbkörpergewebe stimuliert wird.

Eine Beteiligung auch in der Gravidität ist daher wohl nicht ganz auszuschließen. Somit würden auch die fehlenden Unterschiede von Progesteron-, Östradiol-17 β - und PGI₂-Konzentrationen zwischen graviden und zyklischen Tieren durchaus erklärbar (Abb.37 u. 38).

4.3. Prostaglandin - Sekretion während der Graviditätstage 28 - 34

Bei Prostaglandinbestimmungen während der Graviditätstage 28 - 34 konnte, trotz unterschiedlicher Katheterposition, eine gute Übereinstimmung der gemessenen PGF_{2a}-Sekretion bei fünf Kalbinnen festgestellt werden (Abb.33).

Über diesen Graviditätszeitraum sind bisher keine PGF_{2a} - Untersuchungen bei häufiger Blutentnahmefrequenz durchgeführt worden.

Auffallend ist der synchrone PGF_{2a}-Anstieg bei den fünf untersuchten Kalbinnen am Tag 31 auf Konzentrationen von ca. 1000 fmol/ml, auch sind die Schwankungen konsekutiver Proben relativ gering ausgeprägt, so daß eher von einer kontinuierlichen als diskontinuierlichen Sekretionscharakteristik ausgegangen werden kann.

Nicht nur PGF_{2a}, sondern auch 6-keto-PGF_{1a} ist zu diesem Zeitpunkt in ähnlichen Konzentrationen nachweisbar (Abb.34, 35,39).

PGFM, welches nach Granström und Kindahl (1982) als ein guter Indikator für PGF_{2a}-Freisetzungen beim Rind anzusehen ist, steigt ebenfalls am Tag 31 - 32 auf Konzentrationen von 600 fmol/ml an, zeigt jedoch keine absolute Parallelität im Verlauf mit dem primären PGF_{2a}.

Über die Ursache der plötzlichen Prostaglandin-Sekretion in der 5. Graviditätswoche können bis dato nur Vermutungen angestellt werden.

Nach Schrör (1984) und Riefling (1983) wirkt PGF_{2a} konstriktorisch an der glatten Muskulatur, PGI_2 , als stärkster bekannter Inhibitor der Thrombozytenaggregation, bewirkt eine Gefäßdilatation und PGE_2 wirkt luteotrop und gefäßdilatatorisch.

Nun ist es wahrscheinlich von Bedeutung, welches Prostaglandin dominierend wirkt. Wie bereits angesprochen, kann PGE_2 eine PGF_{2a} induzierte Luteolyse verhindern (Henderson et al. 1977), so daß eine Untersuchung lokaler PGE_2 -Konzentrationen zu diesem Zeitpunkt sicherlich neue Erkenntnisse bringen könnte.

Wenn von der Vermutung ausgegangen wird, daß es durch die ebenfalls steigende Östradiol-17 β Sekretion, die durch eine Synthese der fetalen Gonaden und der Eihäute verursacht sein kann (Shemesh und Hansel 1983), zu einer Blutflußsteigerung im graviden Horn kommt und dies zu einer verstärkten Ausschüttung von Prostaglandinen in die Peripherie führt, müßte die Prostaglandin-Sekretion auch über den Tag 34 der Gravidität andauern.

Ford et al. (1981) stellten ab dem 25. Graviditätstag eine Blutflußsteigerung zwar im graviden, nicht aber im ingraviden Horn fest und machten diese aber nicht vom Östradiol-17 β Anstieg zu diesem Zeitpunkt abhängig.

Eine weitere Erklärung für das Auftreten von Prostaglandinen könnte die Entwicklung der Plazentome und das Einsprossen von Mikrovilli des Chorion in das Endometrium sein. Leiser et al. (1975) vermuten, daß der Kontakt mit der Karunkeloberfläche nicht vor dem 30. Tag der Gravidität hergestellt wird und King et al. (1980) beschreiben den Beginn der Plazentombildung genau zu diesem Zeitpunkt, auch sollen am Tag 31/32 neue Blutkreisläufe im Uterus ausgebildet werden.

Interessant beim Verlauf der Prostaglandinprofile ist die gleichbleibend hohe Konzentration und vor allem die fehlende Luteolyse.

Dies bestätigt die These von Schramm et al. (1983) beim Schaf und Feck (1985) beim Rind, die nur mehrmalige PGF_{2a} - Freisetzungen als Voraussetzung für eine Luteolyse ansehen.

Die im Vergleich zur Luteolyse relativ geringeren Prostaglandin-Konzentrationen von ca. 1000 fmol/ml veranlaßten mich zur Absicherung der Daten mittels HPLC - RIA.

Von Mischproben verschiedener Zyklus- bzw. Graviditätsstadien konnte damit eine sehr gute Übereinstimmung mit dem routinemäßig verwendeten Direkt - RIA erzielt werden (Tab. 14).

Ein Vergleich der 6-keto- PGF_{1a} -Konzentrationen in der Vena cava caudalis und in der Peripherie (Aorta abd.) zeigte ein übereinstimmendes Bild am 31. und 32. Graviditätstag (Abb. 34 u. 35). Die Differenz zwischen Aorta abd. und Vena cava caud. wurde gebildet, um die Sekretion aus dem Uterus zu erfassen. Dabei zeigten sich jedoch in 20 % der Bestimmungen, daß die Aorta - Konzentrationen höher sind, als jene in der Vena cava caud., so daß eine PGI_2 - Erfassung aus dem Uterus mit dieser Methode als nicht gesichert angesehen werden kann.

Durch einfache Punktion der Vena jugularis, bzw. durch Implantation eines Dauerkatheters in die Vena jugularis und Blutentnahme wenigstens am 31. und 32. Tag der Gravidität könnten bei einer größeren Anzahl von Tieren Prostaglandine bestimmt werden und so die gefundenen Konzentrationen abgesichert werden.

Die Möglichkeit eines hormonellen Parameters für die positive Graviditätsdiagnostik am Tag 32 sollte in diesem Zusammenhang zumindest theoretisch erwogen werden.

Durch das gleichmäßig hohe Konzentrationsniveau ist die Möglichkeit gegeben, daß selbst durch wenige, oder vielleicht (eine) Blutentnahmen ein 6-keto-PGF_{1a}-Nachweis möglich ist und ein Tier bereits zu diesem Zeitpunkt zumindest vom spezialisierten Labor als gravid angesprochen werden kann.

Dies kann jedoch nicht mit der jüngst aufgezeigten Möglichkeit konkurrieren, ab dem Tag 25 die Gravidität beim Rind mittels Ultraschalldiagnostik zu bestimmen (Kähn 1985).

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt kann das Auftreten von Prostaglandinen an den Graviditätstagen 31/32 nicht endgültig geklärt werden und muß auch aufgrund des doch relativ geringen Probenmaterials noch weiter gesichert werden.

5. Zusammenfassung

Die Steroidhormone Progesteron und Östradiol-17 β sowie die Prostaglandine F_{2a} und der Prostacyclin - Metabolit, 6-keto-PGF_{1a} wurden mittels radioimmunologischer Meßverfahren während des Zyklus und der Frühgravidität des Rindes in Blutplasmaproben ermittelt.

Progesteron, PGF_{2a} und 6-keto-PGF_{1a} wurden direkt im Plasma gemessen. Der Einfluß verschiedener Faktoren auf Variabilität und Präzision des Direkttestes für Progesteron konnte überprüft und erprobt werden. Die Validierung der Methodik und die Überprüfung der Routinemessungen von PGF_{2a} erfolgte mit der Hochleistungs-flüssigkeitschromatographie (HPLC).

Östradiol-17 β Bestimmungen im RIA erfolgten nach Vorreinigung der Plasmaproben mit Dichlormethan. Reproduzierbarkeit und Präzision der radioimmunologischen Bestimmungen waren gut.

Die Entwicklung eines enzymimmunologischen Nachweisverfahrens für PGF_{2a} erwies sich als nicht durchführbar.

Um kurzzeitige Sekretionsmuster und langzeitige Verlaufsveränderungen von Progesteron-, Östradiol-17 β und der Prostaglandine F_{2a} und PGI₂ während des Zyklus und der Frühgravidität zu erfassen, wurden 2 Versuche mit Kalbinnen durchgeführt.

Bei zehn inseminierten Kalbinnen erfolgte eine Blutableitung mittels Dauerkatheter aus der Vena cava caudalis und Aorta abdominalis im Abstand von 15 Minuten über 6 Stunden alle 2-3 Tage.

Die Bestimmung der Ovarsterioide Progesteron und Östradiol-17 β wurden während der ersten 20 Tage des Zyklus und der Frühgravidität durchgeführt. Von zehn inseminierten Tieren blieben sechs gravid, die nichtgraviden Tiere dienten als Kontrollen.

Von 17 inseminierten Kalbinnen, von denen 14 gravid blieben, wurden an den Tagen 14 - 34 zusätzlich zu Intensiventnahmen in 2 - 3 Tagen Abstand, Blutproben alle 2 Stunden gewonnen und Progesteron, Östradiol-17 β und die Prostaglandine F_{2a} und der Metabolit von PGI₂, 6-keto-PGF_{1a} bestimmt.

Die Kurzzeitsekretion von Progesteron und Östradiol-17 β vom Tage der Brunst bis Tag 20 wurde bei 5 ausgewählten Tieren (gravid und zyklisch) detailliert dargestellt.

Ein signifikanter Unterschied zwischen graviden und zyklischen Tieren konnte nicht festgestellt werden. Die Amplituden kurzzeitiger Progesteronfreisetzungen stiegen von Tag 3 - Tag 14 bei beiden Tiergruppen kontinuierlich an. Die Frequenz der Ausschüttung betrug bis zu 1 Puls/Stunde, welche allerdings nur in der Vena cava caudalis nachweisbar war.

Östradiol-17 β zeigte an den Tagen 4 - 7 eine stark ausgeprägte pulsatile Freisetzung hoher Amplituden in der Vena cava caudalis. Auch hier zeigte sich kein Unterschied zwischen zyklischen und graviden Tieren. Eine ähnlich ausgeprägte Freisetzung ist erst ab Tag 20 bei zyklischen Tieren feststellbar.

Eine Beteiligung des Konzeptus an der Östradiol-17 β Produktion konnte nicht festgestellt werden, die Östradiol-17 β Sekretion an den Tagen 4 - 7 wird auf Interöstrusfollikel zurückgeführt, wogegen die Sekretion am Zyklustag 20 von einem sich anbildenden Graaf'schen Follikel ausgeht.

Eine maternale Erkennung der Gravidität über die Hypothalamus-Hypophysenachse mittels Progesteron und Östradiol-17 β kann nicht postuliert und nicht ausgeschlossen werden.

Bis zur Luteolyse treten keine wesentlichen Unterschiede in der Sekretion von Progesteron, Östradiol-17 β , PGF_{2a} und PGI₂ auf.

Die zum Zeitpunkt der Luteolyse beim weiblichen Rind nachweisbaren erhöhten PGF_{2a}-Freisetzungen fehlten bei den graviden Tieren.

Bei umrindernden Kalbinnen mit teilweise verlängertem "Zyklus" wurde die gleiche Sequenz der Luteolyseinduktion, allerdings bis zu einer Woche verzögert, aufgezeigt wie bei zyklischen Tieren.

Eine Beteiligung von Prostacyclin am Luteolysegeschehen konnte nicht festgestellt werden,

Ab Tag 28 der Gravidität war ein kontinuierlicher Östradiol-17 β Anstieg bis zum Tag 34 (Versuchsende) feststellbar.

Am Tag 31 konnten wir erstmals eine synchrone, etwa 1,5 - 2 Tage andauernde PGF_{2a}- und 6-keto-PGF_{2a}-Sekretion mit Maximalwerten bis 1100 fmol/ml in der Vena cava caudalis messen. Über die Herkunft dieser Prostaglandine kann zwar keine Aussage getroffen werden, vielleicht kommt ihnen jedoch durchaus ursächliche Bedeutung bei der Plazentation zu.

Summary

Secretion of ovarian and uterine steroids and prostaglandins during the first 5 weeks of pregnancy in cattle.

The steroids progesterone and oestradiol-17 β and prostaglandin F_{2a} as well as the metabolite of PGI₂, 6-keto-PGF_{1a}, were measured by radioimmunoassays (RIA) in blood plasma of cycling and early pregnant cows.

Progesterone, PGF_{2a} and 6-keto-PGF_{1a} were measured in plasma, without previous extraction. The criteria of validation for the direct assay of progesterone were established.

The method used for routine measurements of PGF_{2a} was validated by high performance liquid chromatography (HPLC). Oestradiol-17 β was determined by RIA after extraction with dichloromethane.

An attempt was made to set up an enzyme-immunoassay for the determination of PGF_{2a}. This approach yielded to many problems and was not continued.

Two experiments were designed to determine secretion patterns of progesterone, oestradiol-17 β , PGF_{2a} and PGI₂ in cycling and early pregnant heifers.

In one experiment 10 animal bearing vena cava caudalis and aorta abdominalis catheters were artificially inseminated; 4 remained non-pregnant and were used as controls. Progesterone and oestradiol-17 β were determined during the first 20 days of early pregnancy or the oestrus cycle. Blood samples were taken at 15 min. intervals for 6 hours every 2 - 3 days.

Seven artificially inseminated heifers (of which 14 became pregnant) were used in a 2nd experiment to determine blood levels of progesterone, oestradiol-17 β , PGF_{2a} and 6-keto-PGF_{1a}. Blood samples were taken every 2 hours during days 14 to 34 after insemination, and in addition every 15 min. for 6 hours at 2 to 3 day intervals.

The detailed short-term secretion patterns of progesterone and oestradiol-17 β from 5 selected animals (pregnant and cycling) during days 0 - 20 after insemination were obtained. There was no significant difference between pregnant and cycling heifers.

The amplitude of the short-term fluctuations of progesterone increased continuously from day 3 to day 14 in both groups. The maximum frequency reached one pulse per hour.

Blood from the vena cava caudalis showed a distinct high amplitude pulses of oestradiol-17 β on days 4 - 7, with no difference between pregnant and non-pregnant animals. Similar distinct pulses are to be seen in cyclic animals after day 20.

A contribution of the conceptus on the production of oestradiol-17 β could not be proven by the described methods of blood sampling. The oestradiol-17 β secretion on days 4 - 7 might be attributed to interoestrus follicles.

A maternal recognition of pregnancy via effects of progesterone and oestradiol-17 β on the hypothalamus-pituitary axis can neither be postulated nor excluded..

Until the usual time of luteolysis there were no differences in the secretion of progesterone, oestradiol-17 β , PGF_{2a} and PGI₂ between pregnant and cycling animals

The spiking release of PGF_{2a} with very high amplitudes present around luteolysis in cycling heifers is missing in pregnant animals.

Heifers showing prolonged oestrous cycles reveal the same sequence of PGF_{2a} -spikes prior to luteolysis induction as normally cycling animals.

An effect of prostacyclin on luteolysis could not be demonstrated.

A continuous rise of oestradiol-17 β was observed from day 28 until day 34 (end of experiment) of pregnant heifers.

We observed for the first time a synchronous secretion of PGF_{2a} and 6-keto- PGF_{1a} starting on day 31 of gestation lasting 1.5 to 2 days. Maximum values of 1100 fmol/ml were reached in the vena cava caudalis.

No conclusions can yet be drawn concerning the origin of these prostaglandins. A potential role regarding placentation has to be evaluated in future experiments.

6. LITERATUR

Adcock, E.W., Teasdale, F., August, C.S., Cox, S., Mechia, G., Battaglia, F.C., Naughton, M.A.

Human chorionic gonadotrophin: Its possible role in maternal lymphocyte suppression.

Science 181, 845-847 (1973)

Allen, W.R., Moor, R.M.

The origin of the equine endometrial cups. I. Production of PMSG by fetal trophoblast cells.

J. Reprod. Fert. 29, 313-316 (1972)

Arnstadt, K.I., Cleere, W.F.

Enzyme-immunoassay for determination of progesterone in milk from cows.

J. Reprod. Fert. 62, 174-180 (1981)

Bazer, F.W., Roberts, R.M., Thatcher, W.W. and Sharp, D.C.

Mechanism related to establishment of pregnancy.

In: Early pregnancy factors, F. Ellendorff and K. Koch (eds). Perinatology Press, Ithaca p. 13-24 (1985)

Beer, A.E., Billingham, R.E.

The embryo as a transplant.

Sci. Am. 230, 36-46 (1974)

Beier, H.M.

Uteroglobin: a hormone-sensitive endometrial protein involved in blastocyst development.

Biochim. Biophys. Acta 160, 289-291 (1968)

Beier, H.M.

Oviducal and uterine fluids.

J. Reprod. Fert. 37, 221-237 (1974)

Beier, H.M.

Uteroglobin, an related biochemical changes in the reproductive tract during early pregnancy in the rabbit.

J. Reprod. Fert., Suppl. 25, 53-69 (1976)

Bergström, S., Carlson, L.A., Weeks, J.R.

The prostaglandins: A family of biologically active lipids.

Pharmacol. Rev. 20, 1-48 (1968)

Bischof, P., Duberg, S., Schindler, A.M., Herrmann, W.L., Sizonenko, P.C.

A hypothesis on the biological function of pregnancy-associated plasma protein A.

in: Grudzinskas, J.G., Teisner, B. & Seppälä, M. (Hrsg.): Pregnancy Proteins.

Academic Press, Sydney, New York, 321-332 (1982)

Breitinger H.

Sekretionsmuster von ovariellern Ocytocin im Zyklus und nach Hysterektomie sowie Versuche zum Einfluß von Ocytocin-Antikörpern auf den Zyklus beim Rind.

Diss. med. vet. München (1984)

Chard, T.

Biological and clinical significance of pregnancy proteins

In: Early Pregnancy Factors, Ellendorf, F., Koch, E., (eds) Perinatology Press. (1985)

Cerini, M.E.D., Chamley, W.A., Findlay, J.K., Goding, J.R.

Luteolysis in sheep with ovarian autotransplants following concurrent infusion of luteinizing hormone and prostaglandin F_{2a} into the ovarian artery.

Prostaglandins 3, 399-404 (1973)

Cerini, M., Cerini, J.C., Findlay, J.K., Lawson, R.A.S.

Preliminary characterisation of pregnancy specific antigen(s) in the ewe.

J. Reprod. Fert. 46, 534, Abstr. (1976)

Chatterjee-Hasrouni, S. Lala, P.K.

The localization of H-2 antigens in mouse trophoblast cells.
J. Exp. Med. 149, 1238-1253 (1979)

Contractor, S.F., Davis, H.

Effect of human chorionic somatomammotrophin and human chorionic gonadotrophin on phytohaemagglutinin-induced lymphocyte transformation.
Nature New Biol. 243, 284-286 (1973)

Cook, B., Karsch, F.J., Foster, D.L., Nalbandov, A.V.

Estrogen-induced luteolysis in the ewe: possible sites of action.
Endocrinology, 94, 1197-1201 (1974)

Dausset, J.

The major histocompatibility complex in man.
Science 213, 1469-1474 (1981)

Del Campo, C.H., Ginther, O.J.

Vascular anatomy of the uterus and ovaries and the unilateral luteolytic effect of the uterus: Histologic structure of uteroovarian vein and ovarian artery in sheep.
Am. J. Vet. Res. 35, 397-399 (1974)

Del Campo, M.R., Rowe, R.F., French, L.R., Ginther, O.J.

Unilateral relationship of embryos and the corpus luteum in cattle.
Biol. Reprod. 16, 580-585 (1977)

Dierschke, D.J., Bhattacharga, A.N., Atkinson, L.E., Knobil, E.

Circhoral oscillations of plasma LH levels in the ovariectomized rheses monkey.
Endocrinology 87, 850-853 (1970)

Ellinwood, W.E., Nett, T.M., Niswender, G.D.

Maintenance of the corpus luteum of early pregnancy in the ewe.

I. Luteotropic properties of embryonic homogenates.

Biol. Reprod. 21, 281-288 (1979)

Engvall E., Pearlmann, P.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G.

Immunochemistry 8, 871-874 (1971)

Enzenhöfer, G.

Analytische Untersuchungen über die primären Prostaglandine F_{2a} und E_2 und ihre 13,14-dihydro-15-keto-Metaboliten im reproduktiven Zyklus des Rindes.

Diss. med. vet. München (1984)

Epstein, C.J., Smith, S., Travis, B.

Expression of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos.

Tissue Antigens 15, 63-67 (1980)

Fabian, G.

The cyclical changes in the uterine lymphatics of the pig. Investigations on the perimetrium.

Lymphology 14, 17-23. (1981)

Faulk, W.P., Galbraith, G.M.P.

Trophoblast transferrin and transferrin receptors in the host-parasite relationship of human pregnancy.

Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci. 204, 85-97 (1979)

Feck, H.

Sekretion der Prostaglandine F_{2a} , E_2 und I_2 während der Frühgravidität und der peripartalen Phase des Rindes.

Diss. med. vet. München (1985)

Feigen, G.A., Fraser, R. C., Peterson, N.S.

Sex hormones and the immune response. 11. Perturbation of antibody production by estradiol-17 β .

Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 57, 488-497 (1978)

Ford, S.P., Chenault, J.R. and Echternkamp S.E.

Uterine blood flow of cows during the oestrous cycle and early pregnancy: effect of the conceptus on the uterine blood supply.

J. Reprod. Fert. 56, 53-62 (1979)

Ford, S.P. Chenault, J.R., Christenson, R.K., Echternkamp, S.E., Ford, J.J.

Effects of preimplantation bovine and porcine conceptuses on blood flow and steroid content of the uterus.

In Cellular and Molecular Aspects of Implantation, pp. 436-438

S.R. Glasser & D.W. Bullock (eds), Plenum Press, New York (1981)

Gadsby, J.E., Burton, R.D., Heap, R.B. & Perry, J.S.

Steroid metabolism and synthesis in early embryonic tissue of pig, sheep and cow.

J. Endocr. 71, 45 P - 46 P (1976)

Gadsby, J.E.

Steroid hormones in blastocyst tissue, uterine flushings and endometrium of pig, sheep and cow.

In: Proteins and Steroids in Early Pregnancy. H.M. Beier and P. Karlson (Eds.) Springer, Berlin, Heidelberg, New York, S. 173-182 (1982)

Glencross, R.G., Munro, T.B., Senior, B.E., Pope, G.S.

Concentrations of oestradiol-17 β , oestron and progesterone in jugular venous plasma of cows during the oestrus cycle and in early pregnancy.

Acta endocrinol. 73, 4, 374-384 (1973)

Goding, J.R.

The demonstration that PGF_{2a} is the uterine luteolysin in the ewe.

J. Reprod. Fert. 38, 261-271 (1974)

Godkin, J.D., Cote, C., Duby, R.T.

Embryonic stimulation of ovine and bovine corpora lutea.

J. Reprod. Fert. 54, 375-378 (1978)

Godkin, J.D., Bazer, F.W. and Roberts, R.M.

Protein production by cultures established from day 14-16 sheep and pig conceptuses.

J. Reprod. Fert. 74, 377-382 (1985)

Granström, E., Kindahl, H.

Species differences in circulating prostaglandin metabolites relevance for the assay of prostaglandin release.

Acta vet. scand., Suppl. 77, 143-158 (1982)

Grewal, A.S., Wallace, A.L.C., Pan, Y.S., Rigby, N.W. Nancarrow, C.D.

A serum factor in pregnant pigs detected by a rosette inhibition test.

Austral. Soc. Reprod. Biol., Christchurch, Proc., 96 (1981)

Gros C., Flecheux O., Dray F.

Enzymatic tracers for steroid EIA.

in: Malvano R.(Ed.) Immunoenzymatic assay techniques pp 45-58. M. Nijhoff, Den Haag (1980)

Hansel, W., Lukaszewska, J., Beal, W.

Maintenance of the bovine corpus luteum of early pregnancy.

Proc. 11th Ann. Meet. Soc. Study Reprod. p. 37 Abstr. (1978)

Heap, R.B., Perry, J.S., Rowlands, I.W.

Corpus luteum function in the guinea pig: arterial luteal progesterone levels and the effect of hysterectomy.

J. Reprod. Fert. 13, 537-553 (1967)

Henderson, K.M., Scaramuzzi, R.J., Baird, D.T.

Simultaneous infusion of prostaglandin E antagonizes the luteolytic action of prostaglandin F_{2a} in vivo.

J. Endocr. 73, 379-383 (1977)

Henricks, D.M., Dickey, J.F., Niswender, G.D.

Serum luteinizing hormone and plasma progesterone levels during the oestrous cycle and early pregnancy in cows.

Biol. Reprod. 2, 346-351 (1970)

Hixon, J.E., Pijanowski, C.J., Weston, P.G., Shanks, R.D., Wagner W.C.

Evidence for an oscillator other than luteinizing hormone controlling the reaction of progesterone in cattle.

Biol. Reprod. 29, 1155-1162 (1983)

Hoffmann, B.

Bestimmung von Steroidhormonen beim weiblichen Rind;

Entwicklung von Meßverfahren und physiologische Daten.

Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg, Fortschritte der Veterinärmedizin, Heft 26 (1977)

Hoffmann B., Kyrein H.J., Ender, M.

An efficient procedure for the determination of progesterone by radioimmunoassay applied to bovine peripheral plasma.

Hormone Research 4, 302-310 (1973)

Hogarth, P.J.

Immunological aspects of mammalian reproduction.

Blackie & Son Ltd., Glasgow, London (1982)

Holness, D.H., Ellison, J.A., Wilkins, L.M.

Conception of beef cows in relation to the concentration of progesterone in peripheral blood.

Rhod. J. agric. Res. 15, 3-9 (1977)

Hosada H., Kobayashi N., Miyairi S., Nambara T.

The specificity in enzyme immunoassay for plasma and urine cortisol.

Chem. Pharm. Bull. 29, 3606-3610 (1981)

Inskeep, E.K., Smutny, W.J., Burcher, R.L. Pexton, J.E.

Effects of intrafollicular injections of prostaglandins in non-pregnant and pregnant ewes.

J. An. Sci. 41, 1098-1104 (1975)

Kähn, W,

Zur Trächtigkeitsdiagnose beim Rind mittels Ultraschall.

Tierärztl. Umschau 40, 472-477 (1985)

Kaltenbach, C.C., Graber, J.W., Niswender, G.D., Nalbandov, A.V.

Luteotropic properties of some pituitary hormones in non-pregnant hypophysectomized ewes.

Endocrinology 103, 385-392 (1968)

Karg, H., Hoffmann, B., Schams, D.

Luteinizing hormone, prolactin and progesterone relationships "in vivo" (data from cow)

Hormonal Steroids: Proceedings of the 3rd. Intern. Congress Hamburg, Sept. 1970;

Excepta Medica Int. Congr. Ser. No. 219 S. 691-698 (1970)

Karg, H., Hartl, M., Hoffmann, B., Schams, D., Schmidt, W.,
Günzler, O., Huber, E., Müller, S.

Versuche mit einem Prostaglandinanalogue zur Zyklussynchroni-
sation beim Rind unter hormonanalytischer und klinischer
Kontrolle.

Zuchthyg. 11, 7-18 (1976)

Karsch, F.J., Roche, J.F., Noveroske, J.W., Foster, D.L.,
Norton, H.W., Nalbandov, A.V.

Prolonged maintenance of the corpus luteum of the ewe by
continuous infusion of luteinizing hormone.

Biol. Reprod. 4, 129-136 (1971)

Kelly, P.A., Robertson, H.A. and Friesen, H.G.

Temporal patterns of placental lactogen and progesterone
secretion in sheep.

Nature 248, 435-437 (1974)

Kesner, J.S., Convey, E.M., Anderson, C.R.

Evidence that estradiol induces the preovulatory LH surge in
cattle by increasing pituitary sensitivity to LHRH and then
increasing LHRH release.

Endocrinology 108, 1386-1391 (1981)

Kindahl, H., Edqvist, L.E., Bane, A., Granström, E.

Blood levels of progesterone and 15-keto-13,14-dihydro-
prostaglandin F_{2a} during the normal oestrous cycle and early
pregnancy in heifers.

Acta endocr. 82, 134-149 (1976)

Kindahl, H., Lindell, J.O., Edqvist, L.E.

Release of prostaglandin F_{2a} during the oestrous cycle.

Acta vet. scand., Suppl. 77, 143-158 (1981)

King, G.J. Atkinson, B.A., Robertson, H.A.

Development of the bovine placenta from days 20 to 29 of
gestation.

J. Reprod. Fert. 59, 95-100 (1980)

Knobil, E.

On the regulation of the primate corpus luteum.

Biol. Reprod. 8, 246-258 (1973)

Koch, E., Ellendorf, F.

Early Pregnancy Faktor (EPF): Mögliche biologische und klinische Bedeutung.

Dtsch. tierärztl. Wschr. 89, 253-258 (1982)

Laster, D.B.

A pregnancy-specific protein in the bovine uterus.

Biol. Reprod. 11, 566-577 (1977)

Leiser, R.

Kontaktaufnahme zwischen Trophoblast und Uterusepithel während der frühen Implantation beim Rind.

Anat. Histol. Embryol. 4, 63-86 (1975)

Little, C.C.

The genetics of tissue transplantation in mammals.

J. Cancer Res. 8, 75-95 (1924)

Lotthammer, K.H.

Milchprogesterontest: Möglichkeiten und Grenzen.

DLG - Mitteilungen 100, 91-94 (1985)

Lukaszewska, J., Hansel, W.

Corpus luteum maintenance during early pregnancy in the cow.

J. Reprod. Fert. 59, 485-493 (1980)

Magness, R.R., Huie, J.M., Weems, C.W.

Effect of contralateral and ipsilateral intrauterine infusion of prostaglandin E₂.

J. An. Sci. 46, Suppl. 1, 376, Abstr. 401 ((1978)

Magness, R.R., Ford, S.P.

Steroid concentrations in uterine lymph and uterine arterial plasma of gilts during the estrous and early pregnancy.

Biol. Reprod. 27, 871-877. (1982)

Mapletoft, R.J., Lapin, D.R., Ginther, O.J.

The ovarian artery as the final component of the local luteotropic pathway between a gravid uterine horn and ovary in ewes.

Biol. Reprod. 15, 414-421 (1976)

Martal, J., LaCroix, M.C., Loudes, C., Saunier, M., Wintemberger-Torres, S.

Trophoblastin, an antiluteolytic protein present in early pregnancy in sheep.

J. Reprod. Fert. 56, 63-73 (1979)

Martensz, N.D., Baird, D.T., Scaramuzzi, R.J., Van Look, P.F.A.

Androstenedione and the control of luteinizing hormone in the ewe during anoestrus.

J. Endocr. 69, 227-237 (1976)

McCracken, J.A., Schramm, W., Barcikowski, B. and Wilson, I.

The identification of prostaglandin F_{2a} as an uterine luteolytic hormone and the hormonal control of its synthesis.

Acta vet. scand., Suppl. 77, 71-88 (1981)

Medawar, P.B.

Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution viviparity in vertebrates.

Symp. Soc. Exp. Biol. 7, 320-338 (1953)

Meizner, I., Glezerman, M., Hardoch, D.B., Leventhal, H.

Abdominal pregnancy following hysterectomy.

Isr. J. med. Sci. 19, 283-285 (1983)

Meyer, H.H.D.

Possibilities to improve enzyme immunoassay (EIA) techniques and their application in animal production.

IAEA - SM - 292/31 (im Druck 1986)

Meyer, H.H.D., Enzenhöfer, G., Feck, H.

Analysis of the prostaglandins PGF_{2a} , PGE_2 , PGFM , PGEM and 6-keto- PGF_{1a} in bovine blood plasma.

Acta endocrinol. (in Vorbereitung 1986)

Meyer, H.H.D., Schallenberger, E., Feck, H.

Secretion of prostaglandins in cattle during early pregnancy.

Acta endocr. 111, Suppl. 274, 40-41 (1986)

Meyer H.H.D., Güven B.

Improvement of microtitration plate enzyme immunoassay for steroid determination by a "second antibody technique"

J. Steroid Biochem. 25, Suppl. Abstr. 139 (1986)

Meziou, W., Chardon, P., Flechon, J.E., Kall, J., Vaiman, M.

Expression of β -2 microglobulin on preimplantation pig embryos.

J. Reprod. Immunol. 5, 73-80 (1983)

Milvae, R.A., Hansel W.

The effect of prostacyclin (PGI_2) and 6-keto- PGF_{1a} on bovine plasma progesterone and LH concentrations.

Prostaglandins 20, 641-647 (1980)

Milvae, R.A., Hansel, W.

Prostacyclin, prostaglandin F_{2a} and progesterone production by bovine luteal cells during the estrous cycle.

Biol. Reprod. 29, 1063-1068 (1983)

Moor, R.M., Rowson, L.E.A.

Local maintenance of the corpus luteum in sheep with embryos transferred to various isolated portions of the uterus.

J. Reprod. Fert. 12, 539-550 (1966a)

Moor, R.M. Rowson, L.E.A.

The corpus luteum of the sheep: effect of the removal of embryos on luteal function.

J. Endocr. 34, 497-502 (1966b)

Morton, H., Hegh, V., Clunie, G.J.A.

Immunosuppression detected in pregnant mice by rosette inhibition test.

Nature 249, 459-460 (1974)

Morton, H., Hegh, V., Clunie, G.J.A.

Studies of the rosette inhibition test in pregnant mice: Evidence for immunosuppression?

Proc. Roy. Soc. Lond. B. 193, 413-419 (1976)

Morton, H., Nancarrow, C.D., Scaramuzzi, R.J., Evison, B.M. Clunie, G.J.A.

Detection of early pregnancy in sheep by the rosette inhibition test.

J. Reprod. Fert. 56, 75-80 (1978)

Morton, H., Tinneberg, H.R., Rolfe, B., Wolf, M., Mettler, L.

Rosette inhibition test: A multicenter investigation of early pregnancy factor in humans.

J. Reprod. Immunol., 4, 251-261 (1982a)

Morton, H., Rolfe, B., Cavanagh, A.

Early pregnancy factor: Biology and clinical significance. in: Grudzinskas, J.G., Teisner, B. & Seppälä, M. (Hrsg.): Pregnancy Proteins, p.p. 391-405

Academic Press, Sydney, New York, (1982b)

Munro C., Stabenfeldt G.

Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone.

J. Endocr. 101, 41-49 (1984)

Murgita, R.A., Tomasi, T.B.

Suppression of the immune response by α -fetoprotein.

II. The effect of mouse α -fetoprotein on mixed lymphocyte reactivity and mitogen-induced lymphocyte transformation.

J. exp. Med. 141, 440-452 (1975)

Nancarrow, C.D., Wallace, A.L.C., Grewal, A.S.

The early pregnancy factor of sheep and cattle.

J. Reprod. Fert. Suppl. 30, 191-199 (1981)

Nelson, J.H., Hall, J.E., Manuel-Limson, G., Freidberg, H. O'Brian, F.J.

Effect of pregnancy on the thymolymphatic system.

Am. J. Obstet. Gynecol. 98, 895-899 (1967)

Nett, T.M., Staigmiller, R.B., Akbar, A.M., Diekman, M.A., Ellinwood, W.E., Niswender, G.D.

Secretion of prostaglandin F_{2a} in pregnant and cycling ewes.

J. An. Sci. 42, 876-880 (1976)

Nett, T.M., Niswender, G.D.

Luteal blood flow and receptors for LH during PGF_{2a} -induced luteolysis; production of PGE_2 and PGF_{2a} during early pregnancy.

Acta vet. scand., Suppl. 77, 117-130 (1981)

Niswender, G.D., Roche, J.F., Foster, D.L., Midgely, A.R.

Radioimmunoassay of serum levels of luteinizing hormone during the cycle and early pregnancy in ewe.

Proc. Soc. exp. Biol. Med. 129, 901-904 (1968)

Northey, D.L., French, L.R.

Effect of embryo removal and intrauterine infusion of embryonic homogenates on the lifespan of the bovine corpus luteum.

J. Anim. Sci. 50. 298-302 (1980)

- Paisley, L.G., Davis, W.C., Anderson, P.B., Michelsen, W.D.
Detection of early pregnancy factor in swine: A need for
dialogue.
Theriogenology 18, 393-401 (1982)
- Rajkowski K.M., Cittanova, N.
The efficiency of different coupling procedures for the
linkage of oestriol-16 α -glucuronide, oestrone-3-glucuronide
and pregnanediol-3 α -glucuronide to four different enzymes.
J. Steroid Biochem. 14, 861-866 (1981)
- Read G.F., Turkes A., Riad-Fahmy, D.
Sensitive specific enzymeimmunoassays for naturally occurring
and synthetic steroids.
Anal. Chem. Symp. Ser. 10, 243-248 (1982)
- Reilly, R.W., Thompson, J.S., Bielski, R.K. Severson, C.D.
Estradiol-induced wasting syndrome in neonatal mice.
J. Immunol. 98, 321-330 (1967)
- Reynolds, L.P., Stigler, J., Hoyer, G.L., Magness, R.R., Huie,
J.M., Hueckstaedt, T.P., Whysong, G.L., Behrman, H.R., Weems, C.
Effect of PGE₁ or PGE₂ on PGF_{2a}-induced luteolysis in non-
bred ewes.
Prostaglandins 21, 957-972 (1981)
- Reynolds, L.P. Robertson, D.A. Ford, S.P.
Effects of intrauterine infusion of oestradiol-17 β and
prostaglandin E₂ on luteal function in non-pregnant heifers.
J. Reprod. Fert. 69, 703-709 (1983)
- Riefling, B.
Prinzipien der Prostaglandinsynthese.
Kontakte (Merck) 2, 26-39 (1983)
- Roberts, G.P., Parker, J.M.
Macromolecular components of the luminal fluid from the
bovine uterus.
J. Reprod. Fert. 40, 291-303 (1974)

Rolfe, B.E., Morton, H., Cavanagh, A.C., Gardiner, R.A.

Detection of an early pregnancy factor-like substance in sera of patients with testicular germ cell tumors.

Am. J. Reprod. Immunol. 3, 97-100 (1983)

Rowson, L.E.A.

The evidence for luteolysin.

Brit. med. Bull. 26, 14 (1970)

Sasser, R.G., Niswender, G.D., Nett, T.M.

Failure of LH and/or prolactin to prevent PGF_{2a}-induced luteolysis of ovine corpora lutea.

Prostaglandins 13, 1201-1208 (1977)

Sawicki, J.A., Magnuson, T., Epstein, C.J.

Evidence for expression of the paternal genome in the two-cell mouse embryo.

Nature 294, 450-451 (1981)

Sauer, M.J., Foulkes, J.A., Cookson A.D.

Direct enzymeimmunoassay of progesterone in bovine milk.

Steroids 38 (1), 45-53 (1982)

Saxena, B.B., Hassan, S.H., Haour, F., Schmidt-Gollwitzer, M.

Radioreceptor assay of human chorionic gonadotropin: detection of early pregnancy.

Science, N.Y. 184, 793-795 (1974)

Schallenberg, E.

Versuche zur Charakterisierung von Sekretionsrhythmen der Gonadotropine und Ovarsterioide während des Brunstzyklus, der Gravidität und post partum beim Rind.

Habilitationsschrift, Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau, Technische Universität München-Weihenstephan (1985)

- Schallenger, E., Schöndorfer, A.M., Walters, D.L.
Gonadotrophins and ovarian steroids in cattle.
I. Pulsatile changes of concentrations in the jugular vein
throughout the oestrous cycle.
Acta Endocrinol. 108, 312-321 (1985a)
- Schallenger, E., Rampp, J., Walters, D.L.
Gonadotrophins and ovarian steroids in cattle.
II. Pulsatile changes of concentrations in the jugular vein
throughout pregnancy.
Acta Endocrinol. 108, 322-330 (1985b)
- Schallenger, E., Schams, D., Meyer, H.H.D., Oschmann, S.J.,
Abele, E.
Secretion of gonadotrophins, steroids and ovarian oxytocin
in cattle during early pregnancy.
Acta endocr. 111, Suppl. 274, 104-105 (1986a)
- Schallenger, E., Meyer, H.H.D., Schams, D., Karg H.
Alternative hormone Mechanismen zur Erhaltung der Früh-
gravidität beim Rind.
Fortschritte in der Fertilitätsforschung 13,
Kongressbericht Celle 1985, Grosse Verlag Berlin, (1986b)
- Schlesinger, M.
Uterus of rodents as site for manifestation of transplantation
immunity against transplantable tumors.
J. Natl. Cancer Inst. 28, 927-946 (1962)
- Schneebeli, J.
Untersuchungen über die sogenannten Interöstrusfollikel bei
umrindernden Färsen.
Vet. med. Diss., Zürich (1977)
- Schneebeli, J., Döbeli, M.
Klinische und hormonanalytische Untersuchungen über das
Vorkommen nicht ovulierender Follikel in der post-partum-
Phase des Rindes.
Schweiz. Arch. Tierheilk. 126, 231-247 (1984)

Schneebeli, J., Eggenberger, D.

Klinische Untersuchungen über die Follikelbildung auf dem Rinderovar.

Schweiz. Arch. Tierheilk. 127, 213-230 (1985)

Schramm, W., Bovard, L., Glew, M.E., Schramm, G., Mc Cracken, J.A.

Corpus luteum regression induced by ultra-low pulses of prostaglandin F_{2a} .

Prostaglandins 26, No. 3 (1983)

Schrör, K.

Prostaglandine und verwandte Verbindungen.

Georg Thieme Verlag Stuttgart (1984)

Schuurs A.H.W.M., Van Weemen B.K.

Enzyme Immunoassay: a powerful analytical tool.

J. Immunoassay 1, 229-249 (1980)

Shemesh, M., Milaguir, F., Ayalon N., Hansel, W.

Steroidogenesis and prostaglandin synthesis by cultured bovine blastocysts.

J. Reprod. Fert. 56, 181-185 (1979)

Shemesh, M., Hansel, W.

Hormone produktion by the early bovine embryo.

J. steroid Biochem. Vol. 19, 979-983 (1983)

Short, R.E., Randel, R.D., Staigmiller, R.B., Bellows, R.A.

Factors affecting estrogen-induced LH release in the cow.

Biol. Reprod. 21, 683-689 (1979)

Silvia, W.J., Ottobre, J.S., Inskeep, E.K.

Concentrations of prostaglandins E_2 , F_{2a} and 6-keto-prostaglandin F_{1a} in the utero-ovarian venous plasma of nonpregnant and early pregnant ewes.

Biol. Reprod. 30, 936-944 (1984)

Siiteri, P.K., Febres, F., Clemens, L.E., Chang, R.J., Gondos, B., Stites, D.

Progesterone and the maintenance of pregnancy: Is progesterone nature's immunosuppressant?

Ann. N. Y. Acad. Sci. 286, 384-397 (1977)

Siiteri, P.K., Stites, D.P.

Immunologic and endocrine interrelationships in pregnancy.

Biol. Reprod. 26, 1-14 (1982)

Smart, Y.C., Fraser, I.S., Clancy, R.L., Roberts, T.K., Cripps, A.W.

Early pregnancy factor as a monitor for fertilization in women wearing intrauterine devices.

Fert. Steril. 37, 201-204 (1982)

Tatarinov, Y.S.

Pregnancy-specific beta-1-glykoprotein, placenta-specific-alpha-1- and alpha-2-microglobulins.

in: Grudzinskas, J.G., Teisner, B. & Seppälä, M. (Hrsg.):

Pregnancy Proteins, p.p 179-194,

Academic Press, Sydney, New York, (1982)

Thatcher, W.W., Wolfenson, D., Curl, J.S., Rico, L.E.,

Knickerbocker, J.J., Bazer, F.W., Drost, M.

Prostaglandin dynamics associated with development of the bovine conceptus.

Anim. Reprod. Sci. 7, 149-176 (1984)

Thatcher, W.W., Knickerbocker, J.J., Helmer, S.D., Hansen, P.J., Bartol, F.F., Roberts, R.M., Bazer, F.W.

Characteristics of conceptus secretory proteins and their effect on PGF_{2a} secretion by the maternal endometrium in cattle.

In: Early Pregnancy Factors, F. Ellendorf, E. Koch (Eds.)

Perinatology Press, Ithaca, p. 25-28 (1985)

Thompson, J., Reilly, R.W., Russe, H.P., Kappas, A.

Effect of oestradiol on bone marrow transplantation in lethally irradiated mice.

Nature 203, 265-267 (1964)

Thorburn, G.D., Cox, R.I., Currie, W.B., Restall, B.J. and Schneider, W.

Prostaglandin F and progesterone concentrations in the uteroovarian venous plasma of the ewe during the estrous cycle and early pregnancy.

J. Reprod. Fert. Suppl. 18, 151-158 (1973)

Van Niekerk, C.H., Morgenthal, J.C., Gerneke, W.H.

Relationship between the morphology and progesterone production by the corpus luteum of the mare.

J. Reprod. Fert., Suppl. 23, 171-175 (1975)

Van de Wiel D.F.M., Koops W.

Direct measurements of progesterone in milk and plasma by a sensitive and simple enzymeimmunoassay.

Brit. vet. J. 138, 454 (1982)

Van Weemen B.K., Schuurs A.H.W.M.

Immunoassay using antigen-enzyme conjugates.

FEBS Letters 15, 232-236 (1971)

Van Weemen B.K., Schuurs A.H.W.M.

The influence of heterologous combinations of antiserum and enzyme-labelled estrogen on the characteristics of estrogen enzyme-immunoassay.

Immunochemistry 12, 667-670 (1975)

Voisin, G.A., Chaouat, G.

Demonstration, nature and properties of maternal antibody fixed on placenta and directed against paternal antigens.

J. Reprod. Fert. Suppl. 21, 89-103 (1974)

Walters, D.L., Schallenberger, E.

Pulsatile secretion of estradiol (E_2) and progesterone (P_4) during the estrous cycle of the cow.

J. Steroid Biochem. 17, Abstract Nr. 270 (1982)

Walters, D.L., Schams, D., Schallenberger, E.

Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during the luteal phase of the oestrous cycle in the cow.

J. Reprod. Fert. 71, 479-491 (1984)

Williams, M.T., Marsh, J.M.

Estradiol inhibition of luteinizing hormone-stimulated progesterone synthesis in isolated bovine luteal cells.

Endocrinology 103, 1611-1618 (1978)

Wilson, Jr., L., Cenedella, R.J., Butcher, R.L., Inskeep, E.K.

Levels of prostaglandins in the uterine endometrium during the ovine estrous cycle.

J. An. Sci. 34, 93-99 (1972)

Yachin, S.

Demonstration of the inhibitory effect of human alpha-feto-protein on in vitro transformation of human lymphocytes.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2857-2861 (1976)

7. Tabellenanhang

Im Tabellenanhang sind die wichtigsten Meßdaten der durchgeführten Versuche aufgelistet.

Weitere Ergebnisse können im Institut für Physiologie der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft Weißenstephan der Technischen Universität München eingesehen werden.

Tab. 14 Kalbin "Ulla" Vergleich Zyklus/Gravidität
Mittelwerte $\pm$ S.D.

Tag n		Z Y K L U S			
		Progesteron ng/ml		Östradiol-17 β pg/ml	
		Aorta	V.cava	Aorta	V.cava
3	25	0.5	0.7 $\pm$ 0.3	1.7 $\pm$ 1.1	4.1 $\pm$ 2.9
5	25	2.1 $\pm$ 0.8	9.2 $\pm$ 3.3	1.3 $\pm$ 0.6	5.1 $\pm$ 2.2
7	25	6.8 $\pm$ 0.8	32.6 $\pm$ 9.3	4.2 $\pm$ 2.5	12.3 $\pm$ 11.0
9	25	7.5 $\pm$ 1.2	33.5 $\pm$ 11.0	9.7 $\pm$ 2.1	12.2 $\pm$ 3.5
12	25	13.0 $\pm$ 2.7	49.5 $\pm$ 12.6	4.1 $\pm$ 1.6	7.3 $\pm$ 4.3
15	25	11.9 $\pm$ 2.4	40.2 $\pm$ 12.7	5.3 $\pm$ 2.5	8.9 $\pm$ 4.7
18	25	16.3 $\pm$ 3.8	64.3 $\pm$ 21.6	3.6 $\pm$ 1.3	8.0 $\pm$ 4.9
20	25	1.4 $\pm$ 0.3	2.8 $\pm$ 1.2	8.4 $\pm$ 2.3	34.8 $\pm$ 18.0

Tag n		G R A V I D I T Ä T			
		Progesteron ng/ml		Östradiol-17 β pg/ml	
		Aorta	V.cava	Aorta	V.cava
1	25	0.5	0.6 $\pm$ 0.1	4.3 $\pm$ 1.9	6.1 $\pm$ 2.0
3	25	0.6 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.5	8.5 $\pm$ 1.9	5.1 $\pm$ 1.7
5	25	1.5 $\pm$ 0.4	8.4 $\pm$ 4.6	4.5 $\pm$ 3.6	5.7 $\pm$ 3.2
7	25	5.2 $\pm$ 0.9	26.3 $\pm$ 11.7	4.0 $\pm$ 1.9	6.7 $\pm$ 3.3
10	25	9.6 $\pm$ 1.6	42.2 $\pm$ 14.5	2.9 $\pm$ 2.2	5.8 $\pm$ 4.3
13	25	12.8 $\pm$ 1.9	40.7 $\pm$ 11.7	4.8 $\pm$ 1.7	5.7 $\pm$ 1.7
16	25	-	-	5.2 $\pm$ 2.3	7.0 $\pm$ 2.9

Tab. 15 (1) Kalbin "Ulla", Progesteron, Östradiol-17 β

Tage p.insem. Uhrzeit	Gravidität				Zyklus			
	Progesteron ng/ml		Östradiol pg/ml		Progesteron ng/ml		Östradiol-17 β pg/ml	
	Aorta	V.c.	Aorta	V.c.	Aorta	V.c.	Aorta	V.c.
1 10.00	0.7	0.7	8.4	5.1	-	-	-	-
10.15	0.5	0.7	4.4	6.3	-	-	-	-
10.30	0.6	0.6	5.6	6.7	-	-	-	-
10.45	0.6	0.6	5.8	7.2	-	-	-	-
11.00	0.5	0.7	7.4	6.7	-	-	-	-
11.15	"	0.6	5.3	11.5	-	-	-	-
11.30	"	0.6	6.5	7.2	-	-	-	-
11.45	"	0.7	6.5	8.8	-	-	-	-
12.00	"	0.9	5.3	7.9	-	-	-	-
12.15	"	0.9	3.9	6.5	-	-	-	-
12.30	"	0.7	4.2	6.3	-	-	-	-
12.45	"	0.8	3.7	10.2	-	-	-	-
13.00	"	0.5	3.2	7.9	-	-	-	-
13.15	"	0.8	2.6	3.9	-	-	-	-
13.30	"	0.8	2.3	5.3	-	-	-	-
13.45	"	0.7	5.8	5.3	-	-	-	-
14.00	"	0.5	5.6	3.2	-	-	-	-
14.15	"	"	2.3	5.1	-	-	-	-
14.30	"	"	3.5	5.3	-	-	-	-
14.45	"	"	3.0	5.1	-	-	-	-
15.00	"	"	2.3	5.3	-	-	-	-
15.15	"	"	2.8	4.4	-	-	-	-
15.30	"	"	1.6	3.9	-	-	-	-
15.45	"	"	2.1	3.9	-	-	-	-
16.00	"	"	2.3	4.2	-	-	-	-

Tab. 15 (2) Kalbin "Ulla", Progesteron, Östradiol-17 β

Tage p.insem. Uhrzeit	Gravidität				Zyklus			
	Progesteron ng/ml		Östradiol-17 β pg/ml		Progesteron ng/ml		Östradiol-17 β pg/ml	
	Aorta	V.c.	Aorta	V.c.	Aorta	V.c.	Aorta	V.c.
3 10.00	0.6	1.1	11.0	9.0	0.5	0.9	4.4	2.8
10.15	0.6	1.0	6.0	6.4	"	0.5	1.4	1.4
10.30	0.5	0.8	9.2	8.3	"	0.8	1.0	3.5
10.45	0.6	0.6	11.3	7.4	"	0.5	2.6	2.3
11.00	0.6	0.7	11.0	6.2	"	0.7	3.3	4.2
11.15	0.7	1.3	9.2	6.9	"	0.5	1.6	6.3
11.30	0.7	1.1	7.8	6.7	"	0.5	1.0	1.6
11.45	0.6	0.8	9.0	4.6	"	0.5	2.6	2.6
12.00	0.7	1.8	7.8	2.3	"	0.7	1.9	1.2
12.15	0.8	1.0	9.0	4.6	"	1.2	1.0	2.6
12.30	0.5	2.4	8.3	5.1	"	0.6	1.0	1.0
12.45	0.7	1.5	11.0	5.5	"	1.9	1.0	2.6
13.00	0.5	1.4	9.4	3.9	"	0.5	1.0	3.3
13.15	0.5	0.6	8.3	3.2	"	0.6	1.0	1.9
13.30	0.6	0.9	8.0	4.8	"	0.5	1.0	11.0
13.45	0.6	0.5	9.0	3.2	"	0.6	1.0	1.6
14.00	0.5	0.7	6.4	6.2	"	1.0	1.0	11.0
14.15	0.6	0.6	7.4	3.2	"	0.6	1.0	1.6
14.30	0.5	1.1	9.2	4.8	"	0.5	4.7	11.2
14.45	0.6	0.7	10.6	4.4	"	0.5	2.3	4.9
15.00	0.5	0.8	8.3	3.0	"	0.7	1.0	6.6
15.15	0.6	0.8	8.1	3.7	"	0.6	1.2	7.0
15.30	0.6	0.8	8.5	4.6	"	0.5	3.0	2.3
15.45	0.6	0.6	7.6	4.4	"	0.5	1.0	1.0
16.00	0.5	0.5	4.5	3.2	"	0.5	1.0	1.0

Tab. 15 (3) Kalbin "Ulla", Progesteron, Ostradiol-17 β

Tage p.insem. Uhrzeit	Gravidität				Zyklus			
	Progesteron ng/ml		Östradiol-17 β pg/ml		Progesteron ng/ml		Östradiol-17 β pg/ml	
	Aorta	V.c.	Aorta	V.c.	Aorta	V.c.	Aorta	V.c.
5 10.00	1.4	9.7	5.2	8.1	1.1	9.6	3.7	7.7
10.15	1.4	12.5	3.3	8.1	1.4	6.5	1.9	5.3
10.30	1.8	4.1	3.6	7.6	1.8	7.4	1.0	8.1
10.45	1.5	9.8	2.6	7.4	1.3	1.4	-	-
11.00	1.8	7.1	5.2	10.5	-	-	1.2	8.4
11.15	1.4	20.2	7.6	9.2	1.9	10.8	1.0	6.5
11.30	1.7	3.0	5.2	10.5	1.7	12.1	1.9	6.0
11.45	1.8	12.1	7.6	9.6	1.8	8.9	1.0	5.3
12.00	1.8	4.2	5.2	10.0	1.8	11.3	1.0	3.0
12.15	2.3	17.5	6.9	5.5	1.6	16.9	1.0	8.6
12.30	1.9	5.6	4.0	6.7	2.0	9.8	1.0	7.0
12.45	1.8	3.9	2.9	4.0	1.8	8.0	"	4.9
13.00	2.0	2.9	1.9	2.0	1.2	7.8	"	6.0
13.15	1.3	6.7	1.7	4.1	2.0	7.2	"	4.2
13.30	1.1	2.6	1.4	3.8	2.1	7.9	"	1.9
13.45	0.7	9.1	1.9	8.3	2.4	6.2	"	1.9
14.00	1.4	10.0	1.4	1.9	3.6	9.9	"	3.0
14.15	1.3	13.7	3.3	6.4	3.3	11.8	"	4.6
14.30	1.3	11.2	2.6	6.0	3.3	12.8	"	6.3
14.45	1.3	8.8	3.1	6.4	4.2	18.8	"	4.4
15.00	1.2	11.0	2.9	5.5	4.9	16.3	"	6.7
15.15	1.6	8.3	1.0	8.8	6.8	15.7	"	5.6
15.30	1.3	7.6	2.1	3.3	6.4	13.5	"	1.0
15.45	1.6	4.9	1.0	2.1	4.7	15.7	"	1.0
16.00	1.0	2.7	1.0	3.3	4.2	18.4	"	4.2

Tab. 15 (4) Kalbin "Ulla", Progesteron, Östradiol-17 β

Tage p.insem. Uhrzeit	Gravidität				Zyklus			
	Progesteron ng/ml		Östradiol-17 β pg/ml		Progesteron ng/ml		Östradiol-17 β pg/ml	
	Aorta	V.c.	Aorta	V.c.	Aorta	V.c.	Aorta	V.c.
7 10.00	4.7	27.5	5.4	11.6	5.8	19.2	5.3	6.0
10.15	3.8	12.2	5.9	5.0	6.2	29.2	2.7	4.9
10.30	3.9	13.2	6.1	3.5	6.3	39.2	3.4	6.3
10.45	4.6	20.5	1.7	10.1	6.7	32.1	4.9	6.7
11.00	5.2	11.4	8.7	7.8	7.4	13.1	4.7	8.7
11.15	4.8	19.0	9.0	10.9	7.1	21.7	6.9	23.1
11.30	5.5	40.4	9.2	13.2	6.5	28.3	11.9	24.2
11.45	5.7	9.2	6.4	6.8	6.6	32.8	7.6	14.8
12.00	5.2	23.5	1.6	3.8	8.0	39.4	6.7	15.5
12.15	4.6	24.3	2.1	3.8	7.0	37.2	4.5	11.0
12.30	4.2	32.2	5.2	4.5	7.2	28.7	1.3	11.2
12.45	4.2	29.2	1.0	7.1	6.4	16.7	2.2	5.6
13.00	4.7	27.5	1.6	5.4	7.3	32.9	2.2	5.6
13.15	4.7	45.6	5.2	5.3	6.0	39.4	5.6	6.3
13.30	7.8	46.2	5.7	9.9	6.0	53.9	1.8	1.0
13.45	5.5	28.1	2.1	14.2	8.2	40.3	1.8	2.2
14.00	6.1	21.1	4.0	14.3	6.6	29.2	1.7	4.7
14.15	4.9	32.6	7.3	13.2	6.4	26.9	4.3	4.3
14.30	5.4	47.1	5.7	21.5	6.0	37.7	2.2	11.9
14.45	5.0	8.1	5.0	4.5	8.9	28.3	3.8	26.4
15.00	5.2	14.7	1.4	7.1	7.7	28.3	6.3	49.1
15.15	6.1	42.9	3.5	4.7	7.4	29.3	5.6	10.1
15.30	5.8	24.1	3.1	3.1	6.6	41.7	2.7	31.1
15.45	7.1	24.9	1.0	4.2	6.4	29.5	3.6	10.9
16.00	5.7	22.5	2.6	3.9	5.9	30.6	1.0	6.4

Tab. 15 (5) Kalbin "Ulla", Progesteron, Östradiol-17 β

Tage p.insem. Uhrzeit	Graviditätstag 10				Zyklustag 9			
	Progesteron ng/ml		Östradiol-17 β pg/ml		Progesteron ng/ml		Östradiol-17 β pg/ml	
	Aorta	V.c.	Aorta	V.c.	Aorta	V.c.	Aorta	V.c.
9 10.00	5.1	50.1	4.5	18.6	6.9	34.0	13.9	10.7
10.15	8.9	59.6	6.4	14.6	6.7	27.0	11.1	11.1
10.30	9.2	33.6	5.9	13.9	6.6	26.7	5.8	10.4
10.45	7.3	32.9	7.0	8.3	9.0	57.3	10.7	14.6
11.00	10.4	30.5	5.2	8.3	9.9	41.5	12.3	19.0
11.15	9.7	41.5	1.4	6.8	10.8	48.3	12.8	12.9
11.30	9.0	44.2	4.5	8.3	7.9	31.4	10.4	22.7
11.45	9.6	40.6	1.0	3.5	7.1	30.6	12.1	10.4
12.00	8.6	43.7	1.0	7.6	7.2	43.8	10.7	14.8
12.15	8.6	50.1	1.0	4.5	8.2	43.9	11.1	17.4
12.30	11.6	22.9	1.0	2.4	8.0	43.8	12.1	14.4
12.45	9.1	17.1	1.0	4.7	7.9	30.4	9.0	12.5
13.00	10.3	51.7	1.0	5.0	7.1	21.4	10.2	13.2
13.15	10.1	38.8	1.0	4.7	7.8	38.5	10.0	9.7
13.30	9.8	27.9	5.2	4.5	6.9	37.2	7.9	9.7
13.45	8.4	47.8	1.0	1.9	7.9	8.8	8.4	9.3
14.00	10.5	41.3	2.4	2.4	8.5	23.2	7.2	7.4
14.15	9.4	47.0	1.0	3.8	6.8	39.4	7.4	9.3
14.30	12.2	52.6	1.0	5.0	5.7	51.4	6.0	10.0
14.45	9.3	29.9	2.6	3.1	8.4	33.1	8.4	14.6
15.00	8.1	66.3	2.6	4.0	5.8	29.6	9.0	10.9
15.15	9.6	40.5	1.0	2.6	6.8	23.9	8.8	11.1
15.30	12.1	69.5	1.0	4.5	7.0	28.1	10.0	11.1
15.45	13.1	65.5	1.0	5.7	6.8	20.5	10.0	8.8
16.00	15.4	33.7	6.4	2.6	7.0	24.5	7.7	10.0

Tab. 15 (6) Kalbin "Ulla", Progesteron, Östradiol-17 β

Uhrzeit	Graviditätstag 13				Zyklustag 12			
	Progesteron ng/ml		Östradiol-17 β pg/ml		Progesteron ng/ml		Östradiol-17 β pg/ml	
	Aorta	V.c.	Aorta	V.c.	Aorta	V.c.	Aorta	V.c.
10.00	10.7	41.1	3.8	10.9	13.7	58.5	8.7	5.4
10.15	11.7	46.9	5.4	6.8	11.8	50.4	4.7	5.2
10.30	10.1	59.3	5.0	6.8	10.8	63.9	3.5	5.0
10.45	12.8	48.9	8.5	7.8	15.8	61.5	4.6	5.7
11.00	10.3	35.5	5.0	9.0	16.0	52.1	5.4	9.0
11.15	11.5	29.3	3.3	9.7	16.2	64.3	6.8	16.3
11.30	10.1	18.9	7.6	5.7	13.9	50.6	3.5	4.6
11.45	9.8	39.3	5.9	7.8	14.4	53.9	3.3	6.6
12.00	13.4	67.7	7.1	6.8	14.8	48.1	1.9	18.9
12.15	14.6	49.1	5.0	7.8	14.9	42.9	3.5	12.0
12.30	14.9	16.3	6.1	3.5	11.8	55.4	5.9	12.0
12.45	15.9	28.4	2.1	4.2	10.6	19.1	3.1	11.8
13.00	13.4	25.9	3.3	6.6	15.5	48.0	3.1	1.4
13.15	15.3	42.4	5.7	5.2	11.6	66.2	4.2	5.4
13.30	14.8	21.9	4.7	6.6	10.7	55.9	2.4	5.4
13.45	11.7	73.7	4.0	6.8	11.6	50.2	2.4	3.5
14.00	15.7	69.0	3.8	3.3	10.7	30.1	3.1	5.0
14.15	12.2	19.9	4.0	3.1	8.5	45.5	4.2	5.9
14.30	13.3	30.8	1.9	8.3	18.2	69.5	5.9	7.6
14.45	12.5	69.0	2.5	7.5	18.1	46.7	4.9	7.8
15.00	13.7	56.9	6.6	10.4	13.2	25.1	2.8	3.1
15.15	10.7	25.4	6.1	5.0	11.7	39.3	4.2	5.4
15.30	14.7	24.5	3.3	7.1	11.1	32.7	1.7	3.1
15.45	12.5	52.0	4.7	6.4	12.1	37.3	4.2	4.0
16.00	14.2	26.6	2.1	4.0	7.7	52.7	4.7	11.3

Tab. 16 Östradiol-17 β -Konzentrationen der Kalbinnen, Grille,
Kali, Lotus. Mittelwerte $\pm$ S.D. (pg/ml)

Tag	Grille Aorta V.cava pg/ml		Kali Aorta V.cava pg/ml		Lotus Aorta V.cava pg/ml	
-1	8.7 $\pm$ 3.5	21.6 $\pm$ 7.7	-	-	-	-
1	4.1 $\pm$ 1.7	5.8 $\pm$ 2.7	-	-	-	-
2	-	-	6.5 $\pm$ 1.6	10.6 $\pm$ 4.7	-	-
3	6.3 $\pm$ 1.6	8.5 $\pm$ 2.2	-	-	4.3 $\pm$ 1.2	7.3 $\pm$ 1.4
4	-	-	6.2 $\pm$ 2.3	19.6 $\pm$ 15.5	6.6 $\pm$ 2.1	9.8 $\pm$ 3.2
5	5.3 $\pm$ 1.7	11.4 $\pm$ 5.4	-	-	7.9 $\pm$ 2.1	34.4 $\pm$ 32.1
6	-	-	5.9 $\pm$ 1.4	12.7 $\pm$ 10.6	-	-
7	3.5 $\pm$ 1.7	4.2 $\pm$ 1.8	-	-	10.0 $\pm$ 1.9	-
9	-	-	4.6 $\pm$ 1.0	6.2 $\pm$ 2.8	6.0 $\pm$ 2.3	8.2 $\pm$ 3.0
10	6.8 $\pm$ 2.2	8.2 $\pm$ 2.3	-	-	5.0 $\pm$ 1.2	6.4 $\pm$ 2.5
12	-	-	4.2 $\pm$ 1.9	4.6 $\pm$ 1.9	-	-
13	4.2 $\pm$ 2.6	7.8 $\pm$ 5.3	-	-	3.2 $\pm$ 1.8	5.5 $\pm$ 2.7

Tab. 17 (1) Kalbin "Grille", Progesteron, Östradiol-17 β
Aorta abd. und Vena cava

Tage p. insem. Uhrzeit	G R A V I D I T Ä T			
	Progesteron (ng/ml)		Östradiol-17 β (pg/ml)	
	Aorta	V. cava	Aorta	V. cava
-1 10.00	-	-	1.0	16.4
10.15	-	-	4.1	13.0
10.30	-	-	10.7	14.1
10.45	-	-	8.7	33.7
11.00	-	-	10.6	22.6
11.15	-	-	10.3	30.1
11.30	-	-	11.4	25.5
11.45	-	-	9.3	24.9
12.00	-	-	6.4	18.9
12.15	-	-	7.1	19.2
12.30	-	-	6.2	10.5
12.45	-	-	7.8	25.5
13.00	-	-	5.9	21.2
13.15	-	-	7.8	20.7
13.30	-	-	8.9	17.6
13.45	-	-	13.0	26.4
14.00	-	-	6.2	13.5
14.15	-	-	11.9	16.4
14.30	-	-	11.0	-
14.45	-	-	5.9	19.4
15.00	-	-	6.2	28.3
15.15	-	-	10.5	27.8
15.30	-	-	6.4	38.5
15.45	-	-	9.8	30.1
16.00	-	-	11.2	26.5

Tab. 17 (2) Kalbin "Grille" Progesteron, Östradiol-17 β
Aorta abd. und Vena cava

Tage p. insem. Uhrzeit	G R A V I D I T Ä T			
	Progesteron (ng/ml)	Östradiol-17 β (pg/ml)		
	Aorta	V.cava	Aorta	V. cava
1 10.00	0.5	0.5	6.7	3.9
10.15	"	"	3.5	5.8
10.30	"	"	6.2	7.1
10.45	"	"	5.8	6.7
11.00	"	"	4.8	9.4
11.15	"	"	5.8	10.6
11.30	"	"	6.7	6.7
11.45	"	"	6.4	9.7
12.00	"	"	7.4	6.9
12.15	"	"	3.7	3.5
12.30	"	"	4.4	4.4
12.45	"	"	4.2	13.3
13.00	"	"	3.2	3.9
13.15	"	"	3.2	5.8
13.30	"	"	3.2	3.5
13.45	"	"	2.1	4.1
14.00	"	"	3.5	5.1
14.15	"	"	2.8	6.9
14.30	"	"	3.7	4.1
14.45	"	"	5.3	7.1
15.00	"	"	1.8	5.5
15.15	"	"	1.4	4.4
15.30	"	"	4.0	4.1
15.45	"	"	1.8	2.8
16.00	"	"	1.0	2.3

Tab. 17 (3) Kalbin "Grille", Progesteron, Östradiol-17 β
Aorta abd. und Vena cava

Tage p. insem. Uhrzeit	G R A V I D I T Ä T			
	Progesteron (ng/ml)		Östradiol-17 β (pg/ml)	
	Aorta	V. cava	Aorta	V. cava
3 10.00	0.5	3.3	6.3	8.4
10.15	"	3.6	7.0	12.4
10.30	"	9.8	-	6.3
10.45	"	4.0	7.7	8.1
11.00	"	3.9	7.2	9.9
11.15	"	5.5	9.7	12.9
11.30	"	4.0	10.2	8.6
11.45	"	2.2	5.4	4.1
12.00	1.0	2.2	6.6	11.5
12.15	1.2	3.5	6.3	5.2
12.30	0.8	5.3	4.5	9.0
12.45	0.6	4.4	6.1	8.4
13.00	0.5	5.6	6.4	9.0
13.15	0.8	5.5	3.4	6.3
13.30	1.0	6.2	4.7	7.7
13.45	0.6	5.6	4.7	9.7
14.00	0.5	5.3	7.0	5.9
14.15	0.5	6.1	7.9	8.8
14.30	0.5	6.1	5.4	8.4
14.45	0.9	5.2	7.5	10.8
15.00	0.5	4.1	5.0	7.2
15.15	0.5	4.3	5.3	8.6
15.30	0.5	4.2	7.5	10.2
15.45	1.0	2.0	4.1	10.8
16.00	0.5	3.2	5.9	5.4

Tab. 17 (4) Kalbin "Grille", Progesteron, Östradiol-17 β
Aorta abd. und Vena cava

Tage p. insemin. Uhrzeit	G R A V I D I T Ä T			
	Progesteron (ng/ml)		Östradiol-17 β (pg/ml)	
	Aorta	V. cava	Aorta	V. cava
5 10.00	1.6	7.7	9.9	8.4
10.15	1.7	10.5	4.2	4.2
10.30	1.8	8.4	6.2	7.4
10.45	1.7	17.6	5.7	12.5
11.00	1.6	19.1	3.7	14.1
11.15	1.9	11.4	6.2	16.1
11.30	2.1	17.1	7.4	13.4
11.45	2.4	9.4	5.7	6.2
12.00	1.3	10.6	5.7	7.7
12.15	2.3	12.2	4.5	6.2
12.30	2.1	11.6	5.0	8.2
12.45	2.2	11.9	4.2	12.2
13.00	2.0	8.7	8.4	14.6
13.15	2.0	22.2	6.0	23.8
13.30	1.4	14.4	6.7	16.4
13.45	1.2	12.0	3.7	24.8
14.00	1.4	4.4	5.2	13.4
14.15	1.3	9.3	3.5	8.4
14.30	1.1	12.7	6.7	6.9
14.45	1.3	9.8	4.2	15.4
15.00	1.0	4.7	5.5	8.2
15.15	1.5	11.1	2.5	4.7
15.30	1.5	15.8	3.2	6.4
15.45	1.0	14.0	3.6	9.4
16.00	1.8	7.8	5.8	15.1

Tab. 17 (5) Kalbin "Grille", Progesteron, Östradiol-17 β
Aorta abd. und Vena cava

Tage p. insem. Uhrzeit	G R A V I D I T Ä T			
	Progesteron (ng/ml)		Östradiol-17 β (pg/ml)	
	Aorta	V. cava	Aorta	V. cava
7 10.00	4.3	18.4	10.6	12.7
10.15	5.2	18.1	4.8	2.4
10.30	5.0	17.5	7.4	3.6
10.45	5.0	19.1	14.0	22.4
11.00	5.4	20.9	1.4	5.8
11.15	6.1	26.2	5.0	7.9
11.30	6.3	23.2	1.0	2.6
11.45	6.2	24.8	3.6	4.3
12.00	-	-	-	-
12.15	5.2	24.9	2.4	2.6
12.30	4.8	22.8	4.1	1.0
12.45	5.2	20.8	2.9	5.5
13.00	4.8	36.7	1.0	4.0
13.15	4.3	31.5	1.0	3.4
13.30	4.8	28.3	2.9	1.0
13.45	4.2	20.3	3.1	5.8
14.00	4.0	14.7	1.2	2.6
14.15	3.5	13.4	3.4	2.9
14.30	5.1	20.1	5.5	6.0
14.45	5.3	22.7	4.3	5.5
15.00	5.7	28.0	3.8	3.6
15.15	5.6	22.1	4.3	1.4
15.30	6.2	31.8	4.8	5.0
15.45	6.1	14.1	4.6	4.3
16.00	7.1	28.6	4.8	5.5

Tab. 17 (6) Kalbin "Grille", Progesteron, Östradiol-17 β
Aorta abd. und Vena cava

Tage p. insem. Uhrzeit	G R A V I D I T Ä T			
	Progesteron (ng/ml)		Östradiol-17 β (pg/ml)	
	Aorta	V. cava	Aorta	V. cava
10 10.00	7.6	31.2	7.7	9.6
10.15	8.4	29.3	6.6	9.1
10.30	7.4	27.8	4.7	9.8
10.45	7.3	27.1	8.0	12.6
11.00	7.3	29.8	6.1	10.1
11.15	8.4	26.4	7.3	9.4
11.30	6.9	21.6	5.9	10.5
11.45	6.7	12.7	5.1	7.7
12.00	8.9	33.6	7.5	7.7
12.15	9.6	37.4	10.5	11.5
12.30	8.2	69.6	9.4	7.0
12.45	11.1	58.4	4.7	7.7
13.00	8.5	60.7	5.4	11.9
13.15	8.2	67.8	4.6	7.5
13.30	10.6	46.3	1.9	5.6
13.45	9.8	55.7	5.9	6.8
14.00	8.3	67.8	8.7	10.5
14.15	12.0	72.7	7.5	12.9
14.30	10.7	62.7	4.4	10.3
14.45	11.7	40.3	6.6	13.3
15.00	9.8	36.9	5.8	9.4
15.15	10.3	46.9	4.0	4.7
15.30	8.9	33.1	3.3	6.8
15.45	9.4	25.8	3.3	4.0
16.00	9.1	33.6	7.7	8.2

Tab. 17 (7) Kalbin "Grille", Progesteron, Östradiol-17 β
Aorta abd. und Vena cava

Tage p. insem. Uhrzeit	G R A V I D I T Ä T			
	Progesteron (ng/ml)		Östradiol-17 β (pg/ml)	
	Aorta	V. cava	Aorta	V. cava
13 10.00	7.2	31.0	4.6	9.6
10.15	7.9	32.1	3.6	7.7
10.30	7.1	32.9	3.5	4.6
10.45	10.1	33.1	7.9	8.9
11.00	8.1	37.3	9.8	5.3
11.15	8.5	47.4	6.7	11.0
11.30	7.8	33.2	7.2	8.4
11.45	9.6	68.9	7.9	15.8
12.00	9.4	56.8	5.5	11.0
12.15	10.3	69.5	6.0	16.3
12.30	11.4	50.3	3.8	25.4
12.45	8.3	47.8	2.9	7.7
13.00	8.1	27.4	1.0	5.0
13.15	7.0	36.4	1.0	4.9
13.30	7.5	26.8	4.3	5.5
13.45	8.1	37.8	1.0	1.0
14.00	10.1	31.0	1.0	4.3
14.15	7.9	37.0	1.9	5.8
14.30	8.3	75.0	3.8	3.8
14.45	9.4	55.3	5.5	10.6
15.00	7.4	38.9	4.6	5.3
15.15	6.7	42.7	5.0	4.8
15.30	8.3	47.0	1.0	6.2
15.45	8.0	38.0	2.9	1.0
16.00	8.5	37.9	1.0	6.0

Tab. 17 (8) Kalbin "Grille", Progesteron, Östradiol-17 β
Aorta abd. und Vena cava

Tage p. insem. Uhrzeit	G R A V I D I T Ä T			
	Progesteron (ng/ml)		Östradiol-17 β (pg/ml)	
	Aorta	V. cava	Aorta	V. cava
16 10.00	8.7	39.8	-	-
10.15	8.9	34.7	-	-
10.30	9.2	35.7	-	-
10.45	4.3	34.4	-	-
11.00	10.4	39.6	-	-
11.15	8.4	31.9	-	-
11.30	7.8	34.2	-	-
11.45	9.9	26.0	-	-
12.00	9.2	75.2	-	-
12.15	9.4	40.4	-	-
12.30	9.6	41.3	-	-
12.45	9.7	61.4	-	-
13.00	9.3	63.0	-	-
13.15	10.0	70.2	-	-
13.30	11.2	42.7	-	-
13.45	11.1	35.7	-	-
14.00	9.8	59.1	-	-
14.15	10.1	52.8	-	-
14.30	10.3	18.1	-	-
14.45	8.1	25.2	-	-
15.00	10.1	18.1	-	-
15.15	7.4	32.5	-	-
15.30	8.6	39.8	-	-
15.45	9.6	31.2	-	-
16.00	8.6	33.3	-	-

Tab. 18 (1) PGF_{2a} (fmol/ml) der graviden Kalbinnen Gül, Wera, Fabiola, Agathe, Helena. Vena cava caud.

Tage p.insem. Uhrzeit		Gül	Wera	Fabiola	Agathe	Helena
28	0.00	<MB	104	-	80	-
	2.00	109	259	-	"	-
	4.00	83	125	-	"	-
	6.00	178	154	-	"	-
	8.00	207	85	-	"	-
	10.00	239	107	-	"	-
	12.00	80	102	-	"	-
	14.00	162	104	-	"	-
	16.00	110	111	-	"	-
	18.00	104	183	-	"	-
	20.00	117	350	-	"	-
	22.00	264	89	-	"	-
29	0.00	174	173	81	"	-
	2.00	92	110	118	"	-
	4.00	134	176	92	"	-
	6.00	238	133	80	"	163
	8.00	83	198	138	"	80
	10.00	272	254	100	"	86
	12.00	341	212	129	"	80
	14.00	166	136	109	"	-
	16.00	133	103	88	"	-
	18.00	240	115	212	"	-
	20.00	183	141	112	"	-
	22.00	156	103	80	"	-

Tab. 18 (2) PGF_{2a} (fmol/ml) der graviden Kalbinnen Gül, Wera, Fabiola, Agathe, Helena. Vena cava caud.

Tage p.insem. Uhrzeit		Gül	Wera	Fabiola	Agathe	Helena
30	0.00	114	156	80	80	176
	2.00	113	400	107	"	-
	4.00	80	123	353	"	379
	6.00	80	96	101	"	-
	8.00	117	142	80	"	221
	10.00	192	188	328	82	80
	12.00	156	110	177	100	123
	14.00	120	114	109	80	80
	16.00	127	117	133	95	175
	18.00	135	82	87	80	80
	20.00	209	131	143	87	136
	22.00	82	113	80	80	90
31	0.00	107	137	145	"	80
	2.00	130	174	431	"	104
	4.00	139	122	231	"	199
	6.00	80	648	81	91	-
	8.00	143	285	201	85	-
	10.00	231	242	80	80	104
	12.00	192	102	111	82	85
	14.00	-	421	80	80	94
	16.00	249	141	"	85	80
	18.00	80	103	"	95	80
	20.00	804	374	"	102	212
	22.00	718	291	"	729	257

Tab. 18 (3) PGF_{2a} (fmol/ml) der graviden Kalbinnen Gül, Wera Fabiola, Agathe, Helena. Vena cava caud.

Tage p.insem. Uhrzeit	Gül	Wera	Fabiola	Agathe	Helena
32 0.00	793	699	711	245	258
2.00	969	442	483	349	283
4.00	367	249	607	320	496
6.00	352	453	642	296	528
8.00	583	188	416	363	336
10.00	602	672	482	226	359
12.00	572	279	543	253	416
14.00	392	269	466	280	209
16.00	563	356	323	212	333
18.00	433	238	347	308	234
20.00	750	298	460	120	381
22.00	437	250	393	170	263
33 0.00	470	277	471	196	268
2.00	475	468	439	169	342
4.00	470	157	453	233	397
6.00	186	129	411	691	119
8.00	98	149	80	80	86
10.00	215	301	453	80	133
12.00	283	123	80	80	80
14.00	85	108	80	80	147
16.00	326	95	85	211	80
18.00	128	164	80	80	121
20.00	80	272	99	91	139
22.00	258	144	80	80	244

Tab. 19 PGF2a (fmol/ml) der graviden Kalbinnen, Gül, Wera, Fabiola, Agathe, Helena. $\bar{x} \pm \text{S.D.}$, $n = 12$

Tag p.insem.	Gül	Wera	Fabiola	Agathe	Helena
28	144 $\pm$ 64	147 $\pm$ 81	-	100 $\pm$ 20	102 $\pm$ 40
29	184 $\pm$ 76	154 $\pm$ 48	117 $\pm$ 38	120 $\pm$ 23	154 $\pm$ 40
30	129 $\pm$ 39	148 $\pm$ 78	212 $\pm$ 152	162 $\pm$ 123	150 $\pm$ 81
31	298 $\pm$ 268	272 $\pm$ 174	283 $\pm$ 256	80	182 $\pm$ 106
32	567 $\pm$ 190	360 $\pm$ 164	515 $\pm$ 150	351 $\pm$ 336	336 $\pm$ 98
33	285 $\pm$ 149	164 $\pm$ 68	209 $\pm$ 48	256 $\pm$ 74	150 $\pm$ 45
34	186 $\pm$ 65	156 $\pm$ 62	167 $\pm$ 32	184 $\pm$ 74	134 $\pm$ 31

Tab. 20 Durchschnittswerte von Östradiol-17 β , 6-keto-PGE $_{1\alpha}$,
PGF $_{2\alpha}$ der graviden Kalbinnen, Wera, Gül, Grille,
Kali, Lotus.

Tage p.insem.	Östradiol-17 β pg/ml	6-keto-PGE $_{1\alpha}$ fmol/ml	PGF $_{2\alpha}$ fmol/ml
1	5.8 $\pm$ 2.7	310 $\pm$ 102	145 $\pm$ 80
2	10.8 $\pm$ 4.7	354 $\pm$ 132	130 $\pm$ 63
3	7.9 $\pm$ 0.8	375 $\pm$ 108	175 $\pm$ 84
4	9.8 $\pm$ 3.2	312 $\pm$ 154	123 $\pm$ 68
5	11.4 $\pm$ 5.4	-	-
6	12.7 $\pm$ 10.7	382 $\pm$ 136	92 $\pm$ 45
7	3.8 $\pm$ 1.8	-	-
8	-	401 $\pm$ 150	125 $\pm$ 52
9	7.2 $\pm$ 1.4	-	-
10	7.3 $\pm$ 1.3	368 $\pm$ 164	142 $\pm$ 92
12	-	315 $\pm$ 183	110 $\pm$ 53
13	6.6 $\pm$ 1.6	-	-
14	9.1 $\pm$ 3.1	264 $\pm$ 133	193 $\pm$ 102
16	9.8 $\pm$ 3.1	304 $\pm$ 186	150 $\pm$ 115
18	9.1 $\pm$ 0.6	250 $\pm$ 179	125 $\pm$ 54
20	7.8 $\pm$ 0.9	276 $\pm$ 89	122 $\pm$ 43
22	12.8 $\pm$ 1.9	301 $\pm$ 135	152 $\pm$ 98
24	12.8 $\pm$ 2.5	343 $\pm$ 196	143 $\pm$ 64
26	-	384 $\pm$ 102	-
28	18.3 $\pm$ 8.9	333 $\pm$ 158	126 $\pm$ 65
29	-	350 $\pm$ 116	150 $\pm$ 75
30	-	375 $\pm$ 127	141 $\pm$ 65
31	20.4 $\pm$ 11.1	542 $\pm$ 178	225 $\pm$ 134
32	-	715 $\pm$ 157	425 $\pm$ 158
33	-	540 $\pm$ 110	243 $\pm$ 104
34	19.5 $\pm$ 8.8	313 $\pm$ 140	205 $\pm$ 94

Tab. 21 (1) Kalbin "Gül", $\text{PGE}_{2\alpha}$, 6-keto- $\text{PGE}_{1\alpha}$,
Östradiol-17 β , Progesteron. Vena cava caudalis.

Tage p.insem. Uhrzeit		$\text{PGE}_{2\alpha}$ fmol/ml	6-keto- $\text{PGE}_{1\alpha}$ fmol/ml	Östradiol-17 β pg/ml	Progesteron ng/ml
28	0	80	80	5.7	12.0
	2	109	"	9.2	12.1
	4	83	"	8.9	23.2
	6	178	"	10.9	27.6
	8	207	"	9.7	25.1
	10	239	"	13.6	12.8
	12	80	"	10.9	68.2
	14	163	"	13.5	76.8
	16	110	"	10.1	44.1
	18	104	"	9.4	26.1
	20	117	"	9.9	22.5
	22	264	"	12.6	39.6
29	0	174	"	10.1	16.5
	2	92	"	12.0	21.3
	4	134	"	10.4	17.8
	6	238	"	14.4	25.6
	8	83	"	10.3	20.7
	10	272	"	18.0	36.7
	12	341	"	13.7	15.6
	14	166	"	15.8	40.4
	16	133	"	10.4	20.2
	18	240	"	9.7	68.6
	20	183	"	7.4	9.6
	22	156	"	9.0	15.9

Tab. 21 (2) Kalbin "Gül" PGF_{2α}, 6-keto-PGF_{1α},
Östradiol-17β, Progesteron. V.cava caud.

Tage p.insem. Uhrzeit		PGF _{2α} fmol/ml	6-keto- PGF _{1α} fmol/ml	Östradiol-17β pg/ml	Progesteron ng/ml
30	0	114	80	8.1	9.0
	2	113	"	5.3	15.0
	4	80	"	9.5	25.5
	6	80	"	13.9	-
	8	117	"	13.7	45.6
	10	192	"	11.2	42.3
	12	156	"	16.6	11.1
	14	120	"	10.0	26.0
	16	127	"	-	43.5
	18	135	"	12.1	75.8
	20	209	"	9.0	9.9
	22	82	"	8.1	24.7
31	0	107	"	9.3	15.6
	2	130	"	9.2	23.5
	4	139	"	10.2	9.0
	6	80	"	-	18.5
	8	143	"	5.3	11.2
	10	231	"	6.5	39.7
	12	192	"	12.0	14.9
	14	-	"	-	-
	16	249	"	9.5	57.5
	18	80	"	10.3	23.7
	20	804	944	14.1	70.5
	22	718	981	9.9	27.4

Tab. 21 (3) Kalbin "Gül" $\text{PGF}_{2\alpha}$, 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$
Östradiol-17 β , Progesteron. V.cava caud.

Tage p.insem. Uhrzeit		$\text{PGF}_{2\alpha}$ fmol/ml	6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ fmol/ml	Östradiol-17 β pg/ml	Progesteron ng/ml
32	0	793	607	13.9	29.4
	2	969	1077	15.1	36.7
	4	367	911	9.5	16.4
	6	352	1187	10.1	21.3
	8	583	755	9.9	20.8
	10	602	898	9.5	60.7
	12	572	1241	15.1	23.1
	14	392	462	10.1	10.8
	16	569	755	9.0	11.3
	18	433	833	11.6	62.1
	20	750	608	11.8	22.3
	22	437	817	12.6	11.8
33	0	470	650	7.6	42.9
	2	475	625	10.1	29.2
	4	470	579	8.6	13.6
	6	186	80	3.8	23.8
	8	98	"	4.4	22.7
	10	215	"	5.0	40.7
	12	283	"	4.4	58.8
	14	85	"	5.9	16.3
	16	326	"	4.2	8.7
	18	128	"	4.6	19.0
	20	80	"	5.3	13.1
	22	80	"	6.0	10.9

Tab. 22 (1) Kalbin "Lea" $\text{PGF}_{2\alpha}$, 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$, Östradiol-17 β , Progesteron. Venä cava caudalis.

Zyklustage	Uhrzeit	$\text{PGF}_{2\alpha}$ fmol/ml	6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ fmol/ml	Östradiol-17 β pg/ml	Progesteron ng/ml
21 (-7)	0	80	80	5.6	14.0
	2	"	"	5.2	7.7
	4	"	"	5.8	9.2
	6	"	"	5.9	17.3
	8	"	"	6.4	17.8
	10	"	81	6.6	26.6
	12	81	80	7.0	26.4
	14	159	206	6.1	10.1
	16	88	80	8.1	12.1
	18	80	"	9.5	5.6
	20	116	"	8.0	8.5
	22	110	"	6.5	7.3
22 (-6)	0	105	"	6.5	32.5
	2	80	"	5.3	10.7
	4	110	"	7.1	16.5
	6	104	155	5.8	51.9
	8	80	80	5.2	13.2
	10	86	"	5.1	7.2
	12	86	"	7.0	85.4
	14	98	"	4.8	4.9
	16	403	"	4.3	17.6
	18	86	"	5.6	9.5
	20	80	"	5.6	4.9
	22	82	"	8.0	55.3
23 (-5)	0	80	"	8.0	30.2
	2	80	"	6.8	6.1
	4	80	"	5.5	8.4

Tab. 22 (2) Kalbin "Lea" $\text{PGF}_{2\alpha}$, 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$, Östradiol-17 β , Progesteron. Vena cava caudalis

Zyklustage Uhrzeit		$\text{PGF}_{2\alpha}$ fmol/ml	6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ fmol/ml	Östradiol-17 β pg/ml	Progesteron ng/ml
23	6	80	80	5.5	14.0
	8	80	80	5.4	74.5
	10	102	80	6.1	8.4
	12	3626	199	5.9	16.4
	14	254	80	6.6	6.8
	16	95	"	6.0	3.2
	18	80	"	6.8	11.3
	20	80	"	7.0	2.6
	22	80	"	11.4	6.1
24 (-4)	0	80	"	9.4	3.0
	2	81	"	18.3	6.1
	4	96	"	12.1	8.5
	6	80	"	7.5	56.0
	8	80	"	5.6	2.3
	10	2853	125	7.2	15.8
	12	131	80	4.8	5.3
	14	86	"	22.0	4.9
	16	91	"	12.1	1.7
	18	95	"	5.3	0.5
25 (-3)	20	1403	"	5.7	0.5
	22	80	"	9.4	0.7
	0	80	"	6.1	0.2
	2	84	"	11.1	0.2
	4	2360	"	7.1	0.2
	6	166	"	6.7	0.2
	8	80	"	5.3	0.2

Tab. 22 (3) Kalbin "Lea", PGE_{2α}, 6-keto-PGF_{1α}, Östradiol-17β, Progesteron, Vena cava caudalis

Zyklustage Uhrzeit		PGE _{2α} fmol/ml	6-keto- PGF _{1α} fmol/ml	Östradiol-17β pg/ml	Progesteron ng/ml
25	10	80	80	7.7	15.3
	12	3965	"	11.9	1.9
	14	253	"	10.5	0.3
	16	100	"	11.0	0.2
	18	95	"	44.0	0.2
	20	146	"	10.0	1.4
	22	180	"	14.4	1.5
26 (-2)	0	114	"	43.6	0.4
	2	80	"	27.3	1.3
	4	102	"	16.3	0.9
	6	1844	"	20.9	1.4
	8	161	"	24.2	0.4
	10	94	"	21.8	1.2
	12	185	114	37.5	0.5
	14	100	80	23.3	0.9
	16	80	"	14.4	0.6
	18	89	"	18.6	0.3
	20	141	"	51.0	0.2
	22	99	"	28.0	0.6
27 (-1)	0	93	"	49.6	0.7
	2	135	"	72.0	0.2
	4	147	"	100.1	0.6
	6	80	"	25.9	0.1
	8	80	"	27.8	0.1
	10	80	"	28.9	0.1
	12	90	"	21.2	0.1

Herrn Professor Dr. Dr. h.c. Heinrich Karg möchte ich für die Aufgabenstellung, sowie für die guten Arbeitsmöglichkeiten in dem von ihm geleiteten Institut danken.

Insbesondere danke ich Herrn Dr. med. vet. Dr. agr. habil. E. Schallenberger für seine Unterstützung, seine vielen Ratschläge sowie für seine Geduld bei der Durchführung der Versuche und seiner dauernden Bereitschaft zu wissenschaftlichen Diskussionen.

Weiterer Dank gilt Herrn Dr. H.H.D. Meyer und seiner Mitarbeiterin B. Dötterböck für die Einführung in die enzymimmunologischen Nachweisverfahren und in die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie. . .

Herzlich bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für ihre zahlreichen Hilfestellungen.

Hervorheben möchte ich die gute Zusammenarbeit mit Frau I. Kaendl ohne deren Einsatz die Auswertung der zahlreichen Blutproben unmöglich gewesen wäre.

Lebenslauf

Name	Eduard Abele
geboren	23.8.1949 in Lauben, Kreis Oberallgäu
Eltern	Josef Abele, Landwirt in Lauben Anna Abele, geb. Müller

Schulischer und beruflicher Werdegang

1955 - 1963	Volksschule in Lauben
1963 - 1967	Mechaniker - Lehre mit Besuch der Berufsschule in Kempten/Allgäu
1967 - 1969	Landwirtschaftliche Lehre
1969 - 1971	Landwirtschaftliche Fachschule in Kempten/Allg.
1971 - 1974	Gehilfe in der elterlichen Landwirtschaft
Mai 1974	Meisterprüfung in der Landwirtschaft
1974 - 1975	Wehrdienst
1975 - 1976	Kraftfahrer
1976 - 1977	Berufsaufbauschule in Freising, Mittlere Reife
1977 - 1979	Berufsoberschule in Landshut, Hochschulreife
1979 - 1984	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maxi- milians-Universität München
Jan. 1985	Staatsexamen
März 1985	Approbation als Tierarzt
Feb. 1985-	
Juli 1986	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physiologie der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft Weihenstephan der Technischen Universität München
	Während dieser Zeit Anfertigung der vor- liegenden Dissertation

